

Aus der Urologischen Klinik
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Christian G. Stief

**Effekte der Ghrelin-Rezeptor-Agonisten L-692,585
und MK 0677 auf die glattnuskuläre Kontraktion
humanen Prostatagewebes**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Maximilian Sterr

aus
München

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Hennenberg
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Seitz apl. Prof. Dr. med. Paul G. Fabricius

Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
--------	--------------------------------------

Tag der mündlichen Prüfung:	25.03.2021
-----------------------------	------------

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Anatomie der Prostata	7
1.1.1 Makroskopische Anatomie	7
1.1.2 Embryologie	7
1.1.3 Mikroskopische Anatomie	9
1.1.4 Anatomie der Leitungsbahnen	10
1.1.4.1 Gefäßversorgung	10
1.1.4.2 Innervation	11
1.2 Physiologie/Funktion	12
1.2.1 Sekretbildung und Zusammensetzung des Ejakulats	12
1.2.2 Erektion	13
1.2.3 Ejakulation	14
1.2.3.1 Emission	14
1.2.3.2 Expulsion	15
1.3 Benignes Prostatasyndrom (BPS) und LUTS	15
1.3.1 Begriffserklärung	15
1.3.2 Epidemiologie	16
1.3.3 Ätiologie	17
1.3.4 Pathophysiologie LUTS	19
1.4 Metabolisches Syndrom und LUTS	20
1.5 Therapie LUTS/BPS	21
1.5.1 Operative Therapie	22
1.5.1.1 Transurethrale Resektion der Prostata (TURP)	22
1.5.1.2 Transurethrale Inzision der Prostata (TUIP)	23
1.5.1.3 Offene Prostatektomie	23
1.5.1.4 Laserverfahren	24
1.5.2 Medikamentöse Therapie	24
1.5.2.1 α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten	25
1.5.2.2 5 α -Reduktase-Inhibitoren (5-ARI)	26
1.5.2.3 Muskarinrezeptorantagonisten (MRA)	27
1.5.2.4 Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE-5-Inhibitoren)	27
1.5.2.5 Phytotherapeutika	28
1.5.2.6 Kombinationstherapien	29

1.5.3	Grenzen der aktuellen medikamentösen Therapieoptionen	29
1.6	Glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata	30
1.6.1	Molekularer Kontraktionsmechanismus (Querbrückenzyklus)	30
1.6.2	Regulation der glattmuskulären Kontraktion	31
1.6.2.1	IP ₃ -Kaskade	32
1.6.2.2	Ca ²⁺ -Sensitisierung	33
1.6.3	α ₁ -Adrenozeptoren in der Prostata	33
1.6.4	Thromboxan A ₂	34
1.6.5	Endotheline	35
1.7	Ghreline	36
2.	Ziele der Arbeit	39
3.	Materialien und Methoden	40
3.1	Verwendetes Gewebe	40
3.2	Kraftmessungen im Organbad	41
3.2.1	Versuchsaufbau	41
3.2.2	Versuchsablauf	42
3.2.2.1	Exkurs: Kontraktion durch KCl	45
3.2.3	1. Versuch: Elektrische Feldstimulation (EFS) mit L-692,585	46
3.2.4	2. Versuch: Kontraktion durch Noradrenalin mit L-692,585	47
3.2.5	3. Versuch: Kontraktion durch Phenylephrin mit MK 0677	48
3.2.6	4. Versuch: Kontraktion durch U46619 mit L-692,585	49
3.2.7	5. Versuch: Kontraktion durch Endothelin-1 mit L-692,585	50
3.3	Immunfluoreszenzfärbung	51
3.4	Western-Blot-Analysen	54
3.4.1	Homogenisation und Proteinbestimmung	54
3.4.2	SDS-PAGE	56
3.4.3	Western-Blot	58
3.5	Auswertung und statistische Methoden	62
4.	Ergebnisse	64
4.1	Organbadversuche	64
4.1.1	Effekte von L-692,585 auf durch EFS induzierte Kontraktion	64
4.1.2	Effekte von L-692,585 auf Kontraktion durch Noradrenalin	66
4.1.3	Effekte von MK 0677 auf Kontraktion durch Phenylephrin	68
4.1.4	Effekte von L-692,585 auf Kontraktion durch U46619	70

4.1.5	Effekte von L-692,585 auf Kontraktion durch Endothelin-1	72
4.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	74
4.3	Western-Blot-Analysen	76
5.	Diskussion.....	78
5.1	Organbadversuche und In-vitro-Studien.....	79
5.2	Gewebe	80
5.3	Vorkommen des GHS-Rezeptors	81
5.4	Wirkung von Ghrelin auf glatte Muskelzellen	82
5.4.1	Neurogene und adrenerge Kontraktion	83
5.4.2	Nicht adrenerge Kontraktion	84
5.4.3	Bedeutung der Effekte von Ghrelin	84
5.5	Klinische Einordnung und Schlussfolgerungen	86
6.	Zusammenfassung	88
7.	Literaturverzeichnis.....	90
8.	Abbildungsverzeichnis.....	97
9.	Tabellenverzeichnis.....	98
10.	Publikationen	99
11.	Danksagung	100

1. Einleitung

Bei Männern, insbesondere im fortgeschrittenen Alter, lassen sich Miktionsbeschwerden sehr häufig auf eine benigne Prostatahyperplasie (BPH) zurückführen [1]. Auch wenn die BPH in manchen Fällen asymptomatisch bleibt, so verursacht sie meist doch eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität [1]. Fast die Hälfte der über 70-jährigen Männer klagt über sogenannte LUTS (Symptome des unteren Harntraktes, *lower urinary tract symptoms*) [2]. Allein in Deutschland geht man von circa fünf Millionen Betroffenen aus [3]. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung sowie der Altersabhängigkeit der Prävalenz werden diese Zahlen in den nächsten Jahren sogar noch zunehmen [1, 2]. Für die Gesundheitssysteme stellt die Behandlung der Patienten eine beachtliche finanzielle Belastung dar [2]. So wurden für die medikamentöse Therapie der BPH im Jahr 2009 weltweit 4,8 Milliarden US-Dollar ausgegeben [1]. In Zukunft werden diese Ausgaben aufgrund des demographischen Wandels aber noch steigen [1]. Ungeachtet dieser Zahlen erhält die BPH in der Fachwelt deutlich weniger Beachtung als maligne Neubildungen der Prostata und auch die medikamentösen Therapieoptionen sind nach wie vor limitiert [1, 4]. Einen neuen Ansatzpunkt für die Behandlung der LUTS infolge BPH könnte das metabolische Hormon Ghrelin darstellen. So gibt es erste Hinweise darauf, dass Ghrelin Prozesse beeinflusst, welche auch bei der Entstehung von LUTS infolge BPH eine Rolle spielen [5-7].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Wege für neuartige Therapieansätze zur Behandlung von LUTS infolge BPH gefunden werden. Hierzu wurden im Labor in-vitro verschiedene Experimente an humanem, nichtmalignem Prostatagewebe durchgeführt und die Rolle von Ghrelin-Rezeptor-Agonisten (GHS-Rezeptor-Agonisten) bei der glattmuskulären Kontraktion von Prostatagewebe näher untersucht.

Zum besseren Verständnis der Grundlagen wird im Folgenden zunächst die Anatomie der Prostata sowie ihre Funktion bzw. Bedeutung für den menschlichen Organismus kurz erklärt. Die aktuell verfügbaren Therapieoptionen werden, genau wie die Zusammenhänge zwischen BPH und LUTS, kurz erläutert und die Grenzen der aktuellen medikamentösen Therapiemöglichkeiten dargestellt.

1.1 Anatomie der Prostata

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Die Prostata ist mit einem Gewicht von etwa 20 Gramm bei 20-jährigen Männern die größte akzessorische Geschlechtsdrüse des Menschen [8, 9]. Sie befindet sich direkt unterhalb der Harnblase und ist mit ihrer kranialen Seite, der Prostatabasis, mit der kaudalen Seite der Blasenwand verwachsen [10]. Die Prostata umgibt so die austretende Urethra am Blasenhals [8]. Die Urethra durchzieht die Prostata mittig von der Basis bis an die kaudale Spitze bzw. den Apex [11]. Der innerhalb der Prostata liegende Bereich der Urethra wird als Pars prostatica bezeichnet [12]. In diesem Bereich macht die Urethra etwa in der Mitte zwischen den beiden Enden einen Knick, wobei das proximale Ende um 35° gegen das distale Ende nach ventral abknickt [11]. Neben der Urethra durchziehen auch die paarig angelegten Ductus ejaculatorii die Prostata. Diese verlaufen parallel zueinander etwa in Verlängerung des distalen Segments in der Längsachse nach kranial [11]. Durch den Knick wird die Urethra in ein proximales und ein distales Segment unterteilt [11]. Etwa im Bereich des Knicks wölbt sich aus der dorsalen Wand der Urethra der Colliculus seminalis (Samenhügel) hervor [11]. Hier münden die beiden Ductus ejaculatorii in die Urethra [11]. Die Prostataspitze grenzt kaudal an das Diaphragma urogenitale [13]. Ventral steht die Prostata durch das Ligamentum puboprostaticum mit der Symphyse in Verbindung [14]. Dorsal der Prostata trennt die Denonvillier-Faszie die Facies posterior der Prostata vom Rektum [14, 15]. Diese Faszie ist auch von klinischer Bedeutung, da sie als Barriere gegen das Übergreifen des Prostatakarzinoms auf das Rektum dient [15]. Die gesamte Prostata ist von einer bindegewebigen Kapsel umgeben von welcher Septen in das Innere des Organs ziehen [8].

1.1.2 Embryologie

Die Entwicklung des Genitaltraktes läuft beim Menschen bis zur Differenzierung der Gonaden zu Ovarien bzw. Testikeln bei beiden Geschlechtern gleich ab [16]. Neben den sexuell indifferenten Gonaden und dem Sinus urogenitalis

sind beim menschlichen Embryo zwei paarige mesodermale Genitalgänge angelegt [16]. Je nach Vorhandensein verschiedener Hormone bei männlichen und weiblichen Embryonen kommt es zu einer jeweils unterschiedlichen Entwicklung der Genitalanlagen [16]. Während aus dem Müller-Gang (Ductus paramesonephricus) die Eileiter, der Uterus sowie der kraniale Teil der Vagina entstehen, degeneriert der Wolff-Gang (Ductus mesonephricus) bei einem weiblichen Embryo [16]. Beim männlichen Embryo hingegen entwickelt sich der Wolff-Gang weiter, während der Müller-Gang degeneriert [16]. Hierbei spielen vor allem zwei verschiedene, im Hoden produzierte, Hormone eine entscheidende Rolle [16]: das von den Sertolizellen gebildete Anti-Müller-Hormon, welches die Regression des Müller-Gangs zur Folge hat, sowie das von den Leydig-Zellen gebildete Testosteron [16]. Testosteron führt direkt zu einer Maskulinisierung des Wolff-Gangs und damit zur Bildung von Nebenhoden, Glandulae vesiculosae sowie Vasa deferentia mit Ductus ejaculatorii [16]. Die Prostata entsteht genau wie die Glandulae bulbourethrales und die Urethra (Pars prostatica und Pars membranacea) aus dem Sinus urogenitalis [16]. Die Entwicklung der Prostata wird dabei durch Dihydrotestosteron, welches aus Testosteron durch 5α -Reduktion entsteht, vermittelt [16, 17]. Ihren Anfang nimmt das Wachstum der Prostata in der 10. Entwicklungswoche mit dem Einwachsen von Endodermknospen aus der urethralen Auskleidung des Sinus urogenitalis in das umgebende und bereits veränderte bzw. verdichtete Mesenchym [11, 16]. Während das Mesenchym später zum fibromuskulären Stroma wird, entsteht aus den Endodermknospen das Drüsengewebe der Prostata [11, 16].

Das Mesenchym verändert bzw. verdichtet sich vor allem in zwei Bereichen [11]:

- An der Hinterwand der distalen Urethra [11]: Hier wird das verdichtete Mesenchym von einer doppelten Reihe Endodermknospen durchdrungen, welche hauptsächlich in seitlicher Richtung wachsen und sich dabei verzweigen [11]. Dieser Bereich wird später als periphere Zone bezeichnet [11].
- Das die Ductus ejaculatorii umgebende verdichtete Mesenchym wird von Gängen durchdrungen, welche dem Colliculus seminealis (Übergangsbereich zwischen Wolff-Gang und Sinus urogenitalis)

entspringen [11]. Das Wachstum findet dabei in Richtung Prostatabasis in Nähe zu den Ductus ejaculatorii statt [11]. Dieser Bereich wird später als zentrale Zone bezeichnet [11].

Im Gegensatz zu diesen beiden Bereichen ist das Mesenchym ventral der distalen Urethra sowie das direkt die proximale Urethra umgebende Mesenchym nahezu azellulär [11]. In diesen Regionen findet eine Gangentwicklung nur sehr begrenzt statt [11]. Entsprechend finden sich im anterioren, proximalen Bereich der adulten Prostata später keine Drüsen und in der präprostatistischen Region lediglich 5 % des gesamten Drüsengewebes [11].

1.1.3 Mikroskopische Anatomie

Die Prostata ist ein heterogenes Organ, dessen verschiedene Gewebekomponenten aber innerhalb der gemeinsamen Organkapsel eng miteinander verschmolzen sind [18]. Aufgrund dieser anatomischen Besonderheit wurde sie lange Zeit als histologisch und anatomisch eher einfach strukturiertes Organ gesehen [11, 18]. Erst McNeal konnte durch seine Untersuchungen an der humanen adulten Prostata die Komplexität der Gewebezusammensetzung darstellen [11]. Gemäß seinem Modell lässt sich die Prostata grundsätzlich in vier Hauptregionen unterteilen, wobei drüsenfreies von drüsenhaltigem Gewebe unterschieden wird [11, 18]. Drei dieser vier Regionen bestehen aus drüsenhaltigem Gewebe, sie werden auch Zonen genannt, und wie folgt unterteilt: Die periphere Zone, die zentrale Zone und die präprostatistische Region [11, 18]. Die vierte Hauptregion ist drüsenfrei und wird als fibromuskuläres Stroma bezeichnet [11]. Anatomischer Referenzpunkt für diese Einteilung ist die Urethra [18]. Sowohl die periphere Zone als auch die zentrale Zone befinden sich distal der Urethra [11]. Während sich die periphere Zone weiter nach lateral und distal erstreckt, befindet sich die zentrale Zone nahe der Ductus ejaculatorii und wird von der peripheren Zone umgeben [11]. Die präprostatistische Region besteht aus einer zylindrischen Muskelmanschette zirkulär um die proximale Urethra sowie aus in diesem Bereich liegendem Drüsengewebe [11]. Das Stroma durchzieht die gesamte Prostata bis hin zum Detrusormuskel am Blasen Hals und ist eng mit dem

Drüsengewebe verbunden [11]. Der Großteil des Stromas liegt jedoch ventral der Urethra [11]. Es macht insgesamt etwa ein Drittel der Gesamtmasse der Prostata aus und ist für die anteriore Form verantwortlich [11]. Die drei drüsenhaltigen Regionen unterscheiden sich jeweils histologisch und auch biologisch, wobei in allen Zonen Endstücke und Ausführungsgänge von sekretorischem zweireihigem, zylindrischem Epithel ausgekleidet sind [18]. Diese sind jeweils dehnbar und können somit als Reservoir für das gebildete Sekret dienen [18]. Unterhalb der sekretorischen Drüsenepithelzellen befindet sich eine Schicht von Basalzellen, welche sich im Zuge der Epithelerneuerung vermutlich zu Drüsenepithelzellen entwickeln sowie vereinzelte serotoninhaltige endokrine Zellen, welche sich zwischen den Drüsenepithelzellen befinden, den Basalzellen aufgelagert sind, jedoch keinen Kontakt zum Lumen des Ausführungsgangs haben [18]. Den größten Anteil des drüsenhaltigen Gewebes nimmt die periphere Zone mit 70 % des drüsenhaltigen Gewebes ein, gefolgt von der zentralen Zone mit 25 % [18]. Das Drüsengewebe der präprostatistischen Region kann unterteilt werden in die Transitionszone, welche etwa 5 % des Drüsengewebes ausmacht, und in die periurethrale Zone, welche weniger als 1 % des Drüsengewebes ausmacht [18]. Die präprostatistische Region ist gegenüber Tumoren weitgehend unempfindlich, als Hauptursprungspunkt der benignen Prostatahyperplasie hingegen von hoher klinischer Relevanz [11, 19].

1.1.4 Anatomie der Leitungsbahnen

1.1.4.1 Gefäßversorgung

Die Terminologie für Arterien, welche die Prostata versorgen, ist nicht einheitlich [12, 20, 21]. So sind die Begriffe A. vesicalis inferior-Rr prostatici sowie Aa. prostatae in Verwendung [12, 20, 21]. Um mit der Bezeichnung alle Arterien, welche die Prostata versorgen, abzudecken, ist der Begriff Aa. prostatae besser geeignet [12].

Die arterielle Versorgung der Prostata unterliegt zahlreichen anatomischen Varianten [20, 21].

Zhang et al. stellten in ihrer Studie mittels Angiographie fest, dass die A. prostatica zu ca. 40 % aus der A. iliaca interna, zu ca. 33 % aus der A. vesicalis superior und zu ca. 28 % aus der A. pudenda interna entspringt [20]. Häufig finden sich zudem noch extraprostatiche Anastomosen zwischen angrenzenden Arterien und der A. prostatica sowie intraprostatiche Anastomosen zur kontralateralen Seite [20]. In 67 % der Fälle wird die Prostata hauptsächlich über eine unilaterale A. prostatica versorgt [20].

De Assis et al. konnten in ihrer ebenfalls mittels Angiographie durchgeführten Studie hingegen folgende Häufigkeiten für den Ursprung der A. vesicalis inferior finden [21]:

- ca. 28,7 % A. iliaca interna zusammen mit A. vesicalis superior
- ca. 14,7 % A. iliaca interna unterhalb der A. vesicalis superior
- ca. 18,9 % A. obturatoria interna
- ca. 31,1 % A. pudenda interna
- ca. 5,6 % andere Ursprungsarterien

Der venöse Abfluss der Prostata erfolgt über Venen, welche der Oberfläche der Prostata entspringen und in den Plexus venosus prostaticus bzw. in den Plexus vesico-pudendalis münden [12]. Dieser mündet schließlich in die V. iliaca interna [12].

1.1.4.2 Innervation

Der Plexus hypogastricus inferior wird aus parasympathischen viszeral efferenten präganglionären Fasern aus den sakralen Segmenten S2-S4 sowie aus sympathischen Fasern der thorakolumbalen Segmente T11-L2 gebildet [12, 22]. Die kaudale Fortsetzung des Plexus hypogastricus inferior ist der Plexus prostaticus [12, 22]. Von dort aus ziehen Nervenfasern zur Prostata und innervieren diese [12]. Der Plexus prostaticus befindet sich, genau wie die für die Erektion wichtigen parasympathischen Nervenfasern, welche die Nn. cavernosi bilden, innerhalb von neurovaskulären Bündeln [12]. Walsh und Donker konnten diese Bündel als einfache Weichgewebsstrukturen an der posterolateralen Oberfläche der Prostata erkennen und haben durch ihre

Erkenntnisse die Folgen der radikalen Prostatektomie revolutioniert [12, 22]. Wenn diese Bündel von der Prostata getrennt werden, ohne sie zu schädigen, kann deren Erhaltung postoperativ zu einer besseren erektilen Funktion führen [12]. Vor dieser Entdeckung war der Verlust der erektilen Funktion eine fast zwangsläufige Folge der Prostatektomie gewesen [12].

1.2 Physiologie/Funktion

1.2.1 Sekretbildung und Zusammensetzung des Ejakulats

Das Ejakulat besteht aus einem kleinen zellulären Anteil und einem nicht zellulären Hauptanteil, dem Seminalplasma [23]. Während die zelluläre Komponente die Spermatozoen sowie Leukozyten und Epithelzellen umfasst, ist das Seminalplasma, dessen Hauptaufgaben Schutz und Nährstoffversorgung der Spermatozoen sind, ein Produkt folgender verschiedener Drüsen [23]:

- 65-75 % Gll. vesiculares (Bläschendrüsen)
- 25-30 % Prostata
- 2-5 % Hoden, Nebenhoden sowie Vasa deferentia
- <1 % Gll. bulbourethrales (Cowper Drüsen)

Das von den Bläschendrüsen gebildete Sekret enthält neben Fructose, die den Spermatozoen als Energiequelle dient, auch das für die Koagulation des Ejakulats verantwortliche Protein Semenogelin-1 [23, 24].

Das Prostatasekret, welches von den Prostataepithelzellen des Drüsengewebes gebildet wird, enthält unter anderem Spermin, Citrat, Zink, die Prostata spezifische Phosphatase sowie das Prostata spezifische Antigen (PSA) [23, 25, 26]. Letzteres spielt eine wesentliche Rolle bei der Verflüssigung des koagulierten Spermas einige Minuten nach der Ejakulation [23, 25]. Die Verflüssigung ist notwendig, um die Spermienmotilität wiederherzustellen und es den Spermien zu erleichtern, in den pH-neutralen Zervixschleim der Frau einzudringen [23, 27, 28]. Es ist wichtig, dass die Spermien, bis sie den Zervixschleim erreicht haben, vor dem sauren Vaginalmilieu und damit vor einer

möglichen Immobilisation geschützt werden [27, 29]. Diesen Schutz gewährleistet ein alkalisches Milieu des Seminalplasmas [29]. Außerdem stabilisiert ein gut ausgeprägtes Puffersystem, für dessen Funktion auch das in der Prostata gebildete Citrat eine wichtige Rolle spielt, durch Proteine und das Kohlensäure-Bikarbonat-System den pH-Wert des Spermas [27, 30]. Zusätzlich wird durch die Koagulation des Ejakulats bis zum Erreichen des Cervix uteri gewährleistet, dass die Spermien in Kontakt mit den Inhaltsstoffen des Ejakulats bleiben, um somit mit Nährstoffen versorgt und vor dem Vaginalmilieu geschützt zu sein [23, 24].

Das im Prostatasekret enthaltene Zink hat eine hohe Bindungsaffinität zum Semenogelin und unterstützt damit die Koagulation des Spermas [28]. Es spielt aber möglicherweise auch noch nach Verflüssigung des koagulierten Spermas eine Rolle [28]. Während der Verflüssigung werden einige Zinkionen vom Semenogelin frei, binden an PSA und inhibieren somit dessen Hydrolyseaktivität, nachdem die Verflüssigung des Spermas stattgefunden hat [28].

Während die Konzentration an PSA im Seminalplasma etwa hundertfach höher ist als im Serum, konnte gezeigt werden, dass bei vorliegendem Prostatakarzinom häufig auch im Serum erhöhte PSA-Werte zu finden sind [23]. Der PSA-Wert spielt deshalb als Tumormarker für das Prostatakarzinom eine wichtige Rolle [23].

Das von der Prostata gebildete Sekret hat entsprechend sowohl für Reproduktionszwecke als auch für diagnostische Zwecke entscheidende Bedeutung [23, 25, 27-30].

1.2.2 Erektion

Die Erektion kann sowohl reflektorisch als auch psychogen erfolgen [31]. Für die reflektorische Erektion sind afferente Fasern des N. pudendus, welche auch bei der Emission und Ejakulation eine Rolle spielen, verantwortlich [31]. Bei Stimulation der genitalen, perinealen und skrotalen Haut leitet der N. pudendus diese sensorische Information zu den Rückenmarkssegmenten S2-S4 [31]. Die psychogene Erektion erfolgt durch auditorische, visuelle oder olfaktorische

Reize [31]. Dabei ziehen zentrale Afferenzen vom Gehirn zu den Rückenmarkssegmenten S2-S4 [31].

Durch die Aktivierung der dort liegenden Nuklei der parasympathischen Nerven werden die efferenten Impulse durch die präganglionären Nn. splanchnici bzw. Nn. erigentes sowie durch die postganglionären Nn. cavernosi zu den Corpora cavernosa geleitet [31]. Die Nn. cavernosi verwenden Stickstoffmonoxid (NO) als Neurotransmitter und spielen eine Hauptrolle bei der Erektion [31]. Durch die NO vermittelte Relaxation der glatten Muskelzellen der Corpora cavernosa und der Aa. helicinae kommt es zum erhöhten arteriellen Blutfluss [31]. Dieser erhöhte Blutfluss bewirkt eine Kompression der Venen gegen die Tunica albuginea, wodurch es zu einem erhöhten Abflusswiderstand der Venen und damit zur Erektion kommt [31].

1.2.3 Ejakulation

Die männliche Ejakulation besteht aus einer Emissionsphase und einer Expulsionsphase [32, 33].

1.2.3.1 *Emission*

Starke cholinerge bzw. parasympathische Stimulation führt zunächst zur Erektion und leitet durch eine erhöhte Sekretion von Nebenhoden, Vesiculae seminales sowie der Prostata die Emission ein [31]. Im weiteren Verlauf wird die Emission durch sympathische efferente Fasern der Segmente T10-L2 vermittelt, welche über den Plexus hypogastricus zum Zielorgan ziehen [32]. Eine erhöhte adrenerge Stimulation hat dabei Kontraktionen des Vas deferens, der Vesiculae seminales sowie der glatten Muskulatur von Prostata und Blasenhalss zur Folge [31]. Es kommt zur Abgabe der Sekrete in die Urethra [32]. Während sowohl der Blasenhalss als auch der M. sphincter urethrae externus noch geschlossen bzw. kontrahiert sind, steigt durch die Emission der intraurethrale Druck in der Pars prostatica urethrae [31, 32].

1.2.3.2 *Expulsion*

Der Emission folgend kommt es zur Expulsion bzw. zur eigentlichen Ejakulation [32]. Durch den hohen Druck in der Urethra kommt es zur Stimulation des N. dorsalis penis bzw. N. pudendus [31]. Dessen Afferenzen sind Teil eines Reflexbogens [32]. Sie werden im Nucleus Onuf sowohl auf efferente Neurone des N. pudendus als auch auf Interneurone, welche mit den sympathischen Rückenmarkssegmenten T10-L2 in Verbindung stehen, umgeschaltet [32]. Durch hohe adrenerge Aktivität und rhythmische somatische Stimulation von sakralen Muskeln kommt es zur Ejakulation [31]. Der M. sphincter urethrae externus relaxiert, woraufhin es zu koordinierten, klonischen Kontraktionen von Prostatamuskulatur, M. bulbocavernosus, M. ischiocavernosus, M. levator ani und M. transversus perinealis profundus kommt [32]. Auf diese Weise wird die Samenflüssigkeit durch die Urethralöffnung nach außen befördert [32]. Das bei einem solchen Samenerguss ausgestoßene Ejakulat hat normalerweise ein Volumen von 2-5 ml bei einer Spermienzahl von 39-400 Millionen Spermien [33, 34].

1.3 Benignes Prostatasyndrom (BPS) und LUTS

1.3.1 Begriffserklärung

Die Beschreibung von Blasenentleerungsstörungen bei Männern fortgeschrittenen Alters ist oft unpräzise [35]. Häufig werden die Begriffe benigne Prostatahyperplasie (BPH) und obstruktive Miktionsstörungen gleichgesetzt [35]. Die Annahme, es gäbe stets einen klaren Kausalzusammenhang zwischen den Symptomen, also den Miktionsstörungen und der zugrundeliegenden Pathophysiologie, ist mit dem derzeitigen Krankheitsverständnis jedoch nicht mehr vereinbar [36, 37]. Es werden daher im Folgenden zunächst kurz die heute üblichen Begriffe präzisiert.

Der Begriff BPH bezeichnet einen gutartigen histologischen Wachstumsprozess in der präprostatischen Region der Prostata [3]. Treffender wird eine solche Veränderung aber als histopathologisch erkennbare BPH (pBPH) bezeichnet [36]. Der stattfindende Wachstumsprozess ist dabei nicht immer

gleichbedeutend mit einer Prostatavergrößerung [3]. So tritt eine Volumenzunahme lediglich in etwa 50 % der Fälle auf und wird dann als BPE (*benign prostate enlargement*) bezeichnet [3, 36, 38].

Eine Blasenauslassobstruktion (*bladder outlet obstruction*, BOO) ist dadurch gekennzeichnet, dass es zu einer Erhöhung des Auslasswiderstandes kommt [3]. Ursache dafür kann eine BPE sein, die Obstruktion wird dann als BPO (benigne Prostataobstruktion) bezeichnet [3, 36, 38].

Der Begriff LUTS (*lower urinary tract symptoms*) ist ein Überbegriff und bedeutet so viel wie „Symptome des unteren Harntrakts“ [3, 37]. Er wurde eingeführt, um Beschwerden beim Wasserlassen unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache zu beschreiben [37]. LUTS kann also sowohl bei Männern als auch bei Frauen jeden Alters auftreten und lässt keine Rückschlüsse auf die zugrunde liegende Erkrankung zu [3].

BPO, BPE und LUTS müssen voneinander unabhängig festgestellt werden, da kein eindeutiger Zusammenhang zwischen ihnen besteht [3].

Der Terminus des benignen Prostatasyndroms (BPS) dient ganz allgemein als Sammelbegriff, um eine Vergrößerung der Prostata (BPE), sich entwickelnde Symptome (LUTS) bzw. eine potentielle Obstruktion BPO bzw. BOO zu beschreiben [36].

1.3.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der pBPH ist stark altersabhängig [9, 39]. Während bei etwa 8 % der Organe in der Altersgruppe der 31-40-Jährigen eine histologisch erkennbare BPH (pBPH) vorliegt, steigt die Prävalenz auf 50 % bei den 51-60-Jährigen, auf 70 % bei den 61-70-Jährigen und auf 90 % bei den 81-90-Jährigen [9, 39]. Wie bereits erwähnt, entwickeln jedoch nicht alle Patienten mit pBPH behandlungsbedürftige LUTS [39].

Im Rahmen einer repräsentativen Studie wurden von Berges et al. Männer ab 50 Jahren regelmäßig untersucht und ihre Symptomatik mittels Fragebogen erfasst [35, 40]. Männer im Alter von 50-59 Jahren klagten zu 20 % über LUTS

(IPSS >7) [41]. Bei den über 70-Jährigen stieg der Anteil auf 40 % [41]. Während in der Altersgruppe der 50-54-Jährigen eine mittlere maximale Harnflussrate (Q_{\max}) von 22,1 ml/s bei einem mittleren Prostatavolumen von 24 ml gemessen wurde, verringerte sich die Q_{\max} im Mittel auf 13,7 ml/s bei einem Prostatavolumen von 38 ml in der Gruppe der ab 75-Jährigen [40, 42].

In den kommenden Jahren ist aufgrund der demografischen Entwicklung eine Zunahme an betroffenen Patienten mit BPH bzw. BPS zu erwarten [40].

1.3.3 Ätiologie

Die genauen Ursachen der BPH sind bislang unklar [17, 19]. Gleichwohl scheinen für die Entstehung einer BPH mehrere, sich teilweise gegenseitig beeinflussende, Prozesse verantwortlich zu sein [17]. Neben genetischer Disposition könnten auch Entzündungsprozesse sowie Übergewicht bzw. Störungen des Fettstoffwechsels zur Entwicklung der Krankheit beitragen [17]. Der Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom und LUTS wird in Kapitel 1.4 genauer beschrieben. Sicher ist, dass das Vorhandensein von Androgenen Voraussetzung dafür ist, dass überhaupt eine BPH entstehen kann [17]. Erste Forschungsergebnisse diesbezüglich datieren zurück ins Jahr 1895 als White hypertrophe Prostatae mittels Kastration behandelte und damit respektable Erfolgsraten vorweisen konnte [43]. Androgene scheinen aber weniger Ursache als Voraussetzung für die Hyperplasie zu sein [17, 43]. Die beiden wichtigsten Androgene bei der Entstehung einer BPH sind das von den Leydig-Zellen gebildete Testosteron sowie Dihydrotestosteron (DHT) [3, 16, 17]. DHT entsteht aus Testosteron durch das Enzym 5 α -Reduktase und zeigt eine deutlich stärkere Affinität für den in Stroma und Drüsenzellen befindlichen Androgenrezeptor als Testosteron [3, 17]. Analog zur Embryonalentwicklung der Prostata spielt Dihydrotestosteron deshalb auch bei der Entstehung der BPH eine wichtigere Rolle als Testosteron [3, 16, 17].

Im Zytoplasma der Prostatazellen kommt es zur Bindung von DHT an den Androgenrezeptor [17]. Daraufhin wird im Zellkern die Bildung von Proteinen induziert, welche die der BPH zugrundeliegende Hyperplasie vermitteln [3, 17]. Therapeutisch lässt sich dieser Zusammenhang durch den Einsatz von

5 α -Reduktase-Inhibitoren nutzen, welche zu einer Verkleinerung der Prostata führen [17]. Die 5 α -Reduktase-Inhibitoren werden in Kapitel 1.5.2.2 genauer beschrieben.

Verschiedene Studien legen den Schluss nahe, dass es auch eine genetische Komponente bei der Entstehung der BPH geben könnte [44, 45]. In ihrer Fall-Kontroll-Studie konnten Sanda et al. zeigen, dass männliche Verwandte von Patienten mit einer frühen Manifestation der BPH (< 64 Jahre) ein erhöhtes kumulatives Lebenszeitrisko haben, sich zur Behandlung ihrer BPH einer Prostatektomie unterziehen zu müssen (66 % gegenüber 17 %) [45]. Die Autoren der Studie schlussfolgerten daraus, dass ein prädisponierendes Gen für die frühe Manifestation der BPH verantwortlich sein muss [45]. In einer weiteren Studie von Sanda et al. wurden neben dem Prostatavolumen der maximale Harnstrahl (Q_{max}), der Serum PSA-Wert, DHT und Testosteron sowie ein Symptomscore bestimmt [44]. Dabei wurden die Werte von Männern mit familiär gehäuft auftretender BPH (d. h. mindestens zwei weitere Familienmitglieder neben dem Probanden litten an BPH) mit den Werten der Kontrollgruppe, in der es kein gehäuftes Auftreten von BPH gab, verglichen [44]. Das gemessene Prostatavolumen der Fallgruppe war hierbei im Mittel 82,7 ml um etwa 50 % größer als bei Männern ohne BPH in der Familie (55,5 ml) [44]. Alle anderen Messwerte waren in beiden Gruppen etwa vergleichbar [44]. Die Ergebnisse legen deshalb den Schluss nahe, dass ein genetischer Faktor, der die familiäre BPH verursacht, seine Wirkung unabhängig von Androgenen vermittelt [44, 45].

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 beschrieben, finden die hyperplastischen Umbauprozesse hauptsächlich in der Periurethral- und in der Transitionszone statt [17-19]. In Kapitel 1.1.2 wurde das Einwachsen von Endodermknospen in das umliegende Mesenchym beschrieben. Analog zu diesem embryologischen Prozess entstehen auch die für die BPH typischen Knoten, indem Drüsengewebe durch Knospung und Verzweigung in fokal proliferierendes Stroma wächst [11, 17, 18]. Als Ursache für diese Umbauprozesse wird eine Reaktion des Prostatagewebes auf Entzündungsmediatoren diskutiert [17, 46]. Durch die Ausschüttung klassischer inflammatorischer Zytokine wie z. B. TNF- α kommt es dabei zur vermehrten Bildung von Interleukin-8 (IL8), welches wiederum einen chronischen Entzündungsprozess aufrechterhält [2, 17, 46]. In

der Folge wird differenzierte glatte Muskulatur in einem sich selbst verstärkenden Effekt durch Myofibroblasten ersetzt [17, 46].

1.3.4 Pathophysiologie LUTS

Eine häufige Begleiterscheinung der benignen Prostatahyperplasie sind Probleme beim Wasserlassen und in der Folge eine reduzierte Lebensqualität [3, 47, 48]. Die betroffenen Patienten klagen zum Beispiel über Restharngefühl, verzögerten Miktionsbeginn, einen abgeschwächten Harnstrahl oder Nachträufeln [47, 49]. Solche Blasenentleerungsstörungen werden auch als obstruktive Symptome bezeichnet [49]. Zusammen mit den irritativen Symptomen bzw. Blasenspeicherstörungen wie beispielsweise einem imperativen Harndrang oder Inkontinenz werden diese Beschwerden als LUTS (*lower urinary tract symptoms*) zusammengefasst [49].

Um den komplexen Zusammenhang zwischen der BPH und LUTS zu verstehen, bietet sich das im Folgenden erklärte Konzept an [48]. Demnach entstehen BPH-bedingte LUTS aufgrund einer Blasenauslassobstruktion (BOO) bzw. benignen Prostataobstruktion (BPO) [3, 48]. Diese Blasenauslassobstruktion ist die Folge einer mechanischen Einengung der Harnröhre [3, 48]. Sie ist hauptsächlich auf zwei zueinander in Beziehung stehende Prozesse zurückzuführen [48]. Dabei kann man eine statische von einer dynamischen Komponente unterscheiden [48]. Die statische Komponente umfasst die Folgen einer Prostatavergrößerung durch exzessives Wachstum des Prostatastromas und der Epithelzellen [48]. Die dynamische Komponente entsteht durch einen erhöhten Tonus der glatten Muskulatur [48].

Wie im Folgenden kurz erläutert, spielen beide Prozesse eine zentrale Rolle bei der aktuellen medikamentösen Therapie BPH bedingter LUTS [50, 51]. Dabei werden zwei Strategien unterschieden. Um die statische Komponente der BPO zu behandeln, werden 5 α -Reduktase-Inhibitoren eingesetzt [50]. Sie blockieren die Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron [52, 53]. In der Folge wird, bedingt durch den resultierenden Androgenmangel, die Apoptose von Prostataepithelzellen und damit eine Volumenreduktion der Prostata ausgelöst [52, 53]. Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie der dynamischen

Komponente sind die in der Prostata befindlichen α_1 -Adrenozeptoren [51]. Durch deren Blockade kommt es zur Relaxation der glatten Muskulatur in der Prostata und zu einer Verbesserung der Symptomatik [50, 51]. Dies geschieht durch den Einsatz von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten, sogenannten α -Blockern [51].

1.4 Metabolisches Syndrom und LUTS

In zahlreichen klinischen und präklinischen Studien konnte in den vergangenen Jahren ein Zusammenhang zwischen Veränderungen des Stoffwechsels einerseits und der Entwicklung sowie Progression von BPH bedingten LUTS andererseits, gezeigt werden [2, 54, 55]. Von besonderem Interesse sind und waren dabei mögliche Auswirkungen des metabolischen Syndroms auf die BPH bzw. LUTS [2]. Das metabolische Syndrom umfasst Stammfettsucht, Bluthochdruck, Dyslipidämie, Insulinresistenz und Glucoseintoleranz [2, 56]. Die einzelnen Komponenten des metabolischen Syndroms können als mögliche Risikofaktoren zur Entstehung einer BPH und damit zu BPH bedingten LUTS beitragen [2, 54]. So scheint die auch beim metabolischen Syndrom auftretende Hypercholesterinämie die Entstehung einer BPH zu begünstigen [17].

Der Zusammenhang zwischen LUTS infolge BPH und dem metabolischen Syndrom hat sich bisher hauptsächlich auf klinische Querschnittstudien gestützt und ist damit eher deskriptiv gewesen, ohne dass bislang auf einen kausalen Zusammenhang geschlossen werden konnte [2, 54, 55]. Studien zur Klärung möglicher kausaler Zusammenhänge zwischen der Entstehung einer BPH und dem metabolischen Syndrom konzentrierten sich in der Vergangenheit hauptsächlich auf die Auswirkungen von Entzündungsmediatoren und Lipoproteinen auf Prostataepithelzellen [2]. Es zeigte sich, dass eine Entzündungsreaktion dieser Zellen nicht nur durch klassische inflammatorische Zytokine, z. B. im Rahmen einer Prostatitis, sondern auch durch metabolische Stimuli wie Insulin oder oxidiertes LDL-Cholesterin ausgelöst werden kann [2, 17]. Dabei werden, als Reaktion auf diese Reize, in den Prostataepithelzellen verschiedene Zytokine, unter anderem Interleukin-8 (IL-8), gebildet, wodurch es zu einer andauernden chronischen Entzündung kommt [2]. Zusätzlich

verursacht IL-8 ein vermehrtes Zellwachstum der Epithelzellen und könnte so in der Folge zur Entstehung von BPH-bedingten LUTS beitragen [2]. Abgesehen von diesen zellulären Abläufen konnte in Tierversuchen durch eine Verringerung der Cholesterinaufnahme eine signifikante Verkleinerung des Prostatavolumens erreicht werden, und damit ein Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom und pathologischen Veränderungen der Prostata bestätigt werden [17]. Trotz dieser wichtigen Erkenntnisse reichen die bislang beschriebenen Zusammenhänge nicht aus, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen verstehen zu können.

1.5 Therapie LUTS/BPS

Bevor mit einer Therapie der LUTS begonnen wird, sollten verschiedene diagnostische Untersuchungen durchgeführt werden [57, 58]. Auf diese Weise kann die Ausprägung der Beschwerden erfasst werden [57]. Mittels Anamnese und körperlicher Untersuchung sollte standardisiert die Symptomatik der Patienten erfasst werden [36]. Am häufigsten wird dazu der IPSS (*international prostatic symptom score*) verwendet [36]. Die Patienten werden gebeten, sieben Fragen zum Miktionsverhalten zu beantworten [36]. Anhand der Angaben werden die Patienten einem Punktwert von 0-35 zugeordnet [36]. Zusätzlich sollten bei jedem Patienten ein Ultraschall der Harnwege, eine Harnflussmessung (Uroflowmetrie) sowie verschiedene Laboruntersuchungen (z. B. PSA-Wert-Bestimmung) durchgeführt werden [36]. Die Uroflowmetrie misst den maximalen Harnstrahl (Q_{\max}) und dient dazu, den Verlauf der Erkrankung zu erfassen [36].

Manchmal sind Männer mit LUTS durch ihre Symptome nicht so stark beeinträchtigt, dass sie eine medikamentöse oder operative Behandlung brauchen [57]. Diesen Patienten kann in der Regel mit einer Strategie des kontrollierten Zuwartens geholfen werden [57]. Auch Patienten, welche sowohl eine medikamentöse als auch eine operative Therapie ablehnen, können für eine solche Strategie geeignet sein [58]. Kontraindiziert ist diese Therapie, genau wie die medikamentöse Therapie, wenn eine absolute Operationsindikation vorliegt [58].

Absolute Operationsindikation nach den Leitlinien der Deutschen Urologen sind [58, 59]:

- „Eine klinisch relevante Blasenauslassobstruktion (BOO),
- BPS-bedingte Komplikationen, wie
 - o rezidivierender Harnverhalt,
 - o rezidivierende Harnwegsinfektionen,
 - o konservativ nicht beherrschbare, rezidivierende Makrohämaturien,
 - o Harnblasenkonkremente,
 - o Dilatation des oberen Harntraktes, eingeschränkte Nierenfunktion oder Niereninsuffizienz durch BOO.“ [58]

1.5.1 Operative Therapie

1.5.1.1 *Transurethrale Resektion der Prostata (TURP)*

Für die Behandlung von LUTS infolge BPO stellt die transurethrale Resektion der Prostata (TURP) bei einem Prostatavolumen von unter 80 ml noch immer die operative Standardtherapie dar [57]. Bei der TURP wird versucht, transurethral Gewebe aus der hauptsächlich von den hyperplastischen Umbauprozessen betroffenen Transitionszone der Prostata abzutragen [17, 18, 57]. In verschiedenen Studien konnten durch die TURP eine Verbesserung der LUTS um 70 % und eine Verstärkung des Harnstrahls um über 100 % gezeigt werden [57]. Für die klinische Beurteilung dieses Verfahrens müssen neben den positiven Ergebnissen aber auch die Komplikationen der TURP beachtet werden. Während die Mortalität in Deutschland innerhalb von 30 Tagen nach dem Eingriff bei 0,1 % liegt, sind das TUR-Syndrom mit einer Häufigkeit von 1,1 %, die transfusionsbedürftige Blutung mit 3,6 % sowie eine notwendige operative Revision in 5,4 % der Fälle die häufigeren Komplikationen [57, 59]. Beim TUR-Syndrom handelt es sich um eine hypotone Hypervolämie durch Aufnahme von bei der monopolen TURP verwendeter niederosmolarer Spüllösung in den Kreislauf [60-62]. In Folge dieser Aufnahme kann es dann zur Elektrolytstörung kommen [61]. Um die Gefahr des TUR-Syndroms auszuschließen, ist es möglich, anstatt der monopolen Resektion eine bipolare TURP unter Verwendung elektrisch leitender isotoner Kochsalzlösung

durchzuführen [61, 63]. Ausgehend von der Resektionsschlinge kann der Strom in diesem Fall über die Kochsalzlösung an einen zweiten Pol am Rektoskop zurückfließen [57, 60-62]. Der Patient wird im Gegensatz zur monopolaren Resektion also nicht von Strom durchflossen [57, 61, 62]. Für die Behandlung von LUTS infolge BPO stellt die bipolare TURP eine gute Alternative zur monopolaren TURP dar [57, 60, 61, 64]. Die Wirksamkeit beider Verfahren ist vergleichbar, perioperative Komplikationen sind bei der bipolaren TURP hingegen seltener [57, 64].

1.5.1.2 *Transurethrale Inzision der Prostata (TUIP)*

Bei der transurethralen Inzision der Prostata (TUIP) wird endoskopisch eine Inzision an der Prostata bzw. am Blasen Hals vorgenommen [57]. Dieser Eingriff geschieht im Gegensatz zur TURP ohne Gewebse Entfernung [57]. Die Behandlungsergebnisse von TUIP und TURP sind bei Patienten mit kleiner Prostata und moderaten LUTS ähnlich gut [57, 65, 66]. Nach einer TUIP ist zwar seltener mit Nebenwirkungen zu rechnen, dafür muss aber langfristig öfter nachoperiert werden als bei der TURP [59, 65]. Ausschlaggebend für die Wahl des Therapieverfahrens ist letztlich die Größe des Organs [57]. Bei einem Prostata Volumen von unter 30 ml sollte eine TUIP durchgeführt werden, bei einem Volumen zwischen 30 und 80 ml eine TURP [57, 59, 67].

1.5.1.3 *Offene Prostatektomie*

Als konventionelles Operationsverfahren dient die offene Prostatektomie schon sehr lange zur Behandlung von LUTS infolge BPH [57, 59, 68]. Dabei liefert sie auch heute noch langfristig gute Behandlungsergebnisse mit einer Symptomreduktion von bis zu 86 % und einer durchschnittlichen Verbesserung der Harnflussrate um 375 % [57]. Die Mortalität wird je nach Studie mit 0,2-0,25 % angegeben, die Gefahr einer transfusionsbedürftigen Blutung liegt mit 7-14 % deutlich über den Werten für die TURP [57, 61]. Häufige langfristige Komplikationen sind eine Dranginkontinenz sowie Blasen Halsstenosen oder

Strikturen der Urethra [57, 69, 70]. Bei etwa 4-6 % der Patienten muss aufgrund von Komplikationen nachoperiert werden [60, 61, 69, 70]. Indiziert ist die offene Prostatektomie zur Behandlung von LUTS heute in der Regel nur noch bei großem Prostatavolumen ab 70-80 ml [57, 60, 61].

1.5.1.4 Laserverfahren

Zusätzlich zu den bereits genannten, etablierten Verfahren, stehen für die Behandlung des BPS mittlerweile auch verschiedene neuartige Laserverfahren zur Verfügung [71, 72]. Je nach Wellenlänge der Laserstrahlen kann durch unterschiedliche Eindringtiefen ins Gewebe ein unterschiedlich starker Gewebeabtrag durch die einzelnen Verfahren erreicht werden [60, 61, 72]. Während einige Verfahren gute Ergebnisse liefern, ist bei anderen Verfahren die Studienlage bezüglich der Wirksamkeit noch unzureichend [71].

1.5.2 Medikamentöse Therapie

Für die medikamentöse Therapie BPH bedingter LUTS stehen fünf verschiedene Arzneimittelgruppen zur Verfügung: α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten (α -Blocker), 5 α -Reduktase-Inhibitoren (5-ARI), Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE-5-Inhibitoren), Muskarinrezeptor-Antagonisten sowie Phytotherapeutika [73]. Häufig wird auch eine Kombinationstherapie mit α -Blockern und 5-ARI durchgeführt [74, 75]. Diese beiden Arzneimittelgruppen haben zumindest unter den verschreibungspflichtigen BPH-Medikamenten den höchsten Marktanteil und zählen zur medikamentösen Erstlinientherapie der entsprechenden Leitlinien [1, 58, 59]. Im Folgenden werden die für die Behandlung BPH bedingter LUTS verwendeten Medikamente genauer vorgestellt.

1.5.2.1 α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten

α -Blocker stellen die Therapie der ersten Wahl dar, um BPH bedingte LUTS zu behandeln [57, 76]. Wie bereits in Kapitel 1.1.3 erwähnt, findet sich in der Prostata neben dem Drüsengewebe auch fibromuskuläres Stroma. Die in diesem Stroma befindliche und durch den Sympathikus regulierte glatte Muskulatur dient, genau wie die glatte Muskulatur des Blasenhalses und der Prostatakapsel, als Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie mit α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten [3, 77, 78]. Ziel dabei ist es, durch die kompetitive Hemmung der in der glatten Muskulatur befindlichen α_1 -Adrenozeptoren, den Blasenauslasswiderstand bzw. die Blasenauslassobstruktion zu reduzieren [52, 53, 78]. Die BOO wird unter α -Blocker-Therapie jedoch weniger beeinflusst als ursprünglich angenommen [53]. Es scheint, als wäre eine Verbesserung der Symptomatik eher auf eine Blockade von in Rückenmark und Blase befindlichen Adrenorezeptoren zurückzuführen [52, 53]. Darauf deuten auch die Beobachtungen einer Verbesserung von LUTS bei Männern, welche keine BPO haben, als auch die Verbesserung von LUTS bei Frauen, hin [50]. Man geht also heute von Prostata abhängigen und Prostata unabhängigen Wirkmechanismen der α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten aus [50].

Zugelassen zur Therapie von LUTS sind in Deutschland in alphabetischer Reihenfolge: Alfuzosin, Doxazosin, Silodosin, Tamsulosin und Terazosin [52, 53]. Alle α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten haben bei Verabreichung entsprechend ihrer therapeutischen Dosierung trotz unterschiedlicher Selektivität zu den verschiedenen Subtypen der α_1 -Adrenozeptoren eine vergleichbare Wirksamkeit [52, 53, 79]. Durch Therapie mit α -Blockern wird vor allem eine schnelle Verbesserung der BPS-Symptome bzw. der LUTS erreicht [52, 53]. So lässt sich bereits nach wenigen Tagen unabhängig von Prostatavolumen, Symptomausprägung oder Alter ein Effekt nachweisen [52, 53]. Die Wirkung der α -Blocker ist jedoch begrenzt: In Studien konnte kein Einfluss auf eine mögliche Reduktion der Krankheitsprogression festgestellt werden [52, 53]. Sowohl Prostatavolumen als auch das Wachstum der Prostata blieben unbeeinflusst [52, 53]. Auch kann ein akuter Harnverhalt durch eine längerfristige Therapie nicht verhindert werden [52, 53]. Typische

Nebenwirkungen sind Abgeschlagenheit, Blutdruckabfall, Durchfall, Kopfschmerzen, Müdigkeit sowie Schwindel [52, 53]. Teilweise klagen Patienten auch über Ejakulationsstörungen [52, 53]. Nach Absetzen der α -Blocker bilden sich die Nebenwirkungen in der Regel zurück [53]. Bei orthostatischer Dysregulation, Angina pectoris und bei bevorstehender Kataraktoperation sind α -Blocker kontraindiziert [52, 53]. Bei Kataraktoperationen kann es im Falle einer vorherigen Einnahme zum intraoperativen Floppy-Iris-Syndrom kommen [52, 53]. α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten eignen sich somit vor allem zur symptomatischen Behandlung des BPS bzw. der LUTS infolge BPH und nicht zur Behandlung der den Symptomen zugrundeliegenden Erkrankung [52, 53].

1.5.2.2 *5 α -Reduktase-Inhibitoren (5-ARI)*

Um einer BPH-Progression entgegenzuwirken, werden 5 α -Reduktase-Inhibitoren (5-ARI) eingesetzt [74]. In Deutschland sind zwei verschiedene 5-ARI zugelassen: Dutasterid und Finasterid [52, 53]. Beide blockieren das für die Umwandlung von Testosteron in DHT wichtige Isoenzym der 5 α -Reduktase Typ 2 [52, 53, 80]. Dutasterid hemmt zusätzlich auch den Typ 1 des Isoenzym [52, 53, 80]. Beide Substanzen zeigen bezüglich Volumenreduktion der Prostata, Stärke des Harnstrahls sowie Verbesserung der Symptomatik nach einem Jahr Behandlung einen ähnlichen Effekt [52, 53, 80]. Wie bereits im Kapitel 1.1.3 erläutert wird, ist die 5 α -Reduktase von entscheidender Bedeutung für die Entstehung des BPS [52, 53]. Durch die Blockade dieses Enzyms kommt es aufgrund eines Androgenmangels zur Apoptose von Prostataepithelzellen und in der Folge zu einer Volumenreduktion der Prostata [52, 53]. Bei Männern mit mittelschweren LUTS treten unter 5-ARI-Therapie seltener akute Harnverhalte auf und auch die Wahrscheinlichkeit, sich einer TURP unterziehen zu müssen, sinkt deutlich [52, 53, 81, 82]. Sowohl Symptomatik als auch Harnstrahlstärke der Patienten verbessern sich durch die Einnahme von 5-ARI. Die Wirkung ist jedoch weniger stark und wird erst nach längerer Behandlungsdauer als bei Einnahme von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten erreicht. [52, 53, 82]. Die häufigsten Nebenwirkungen sind die erektile Dysfunktion, Ejakulationsstörungen sowie

Libidoverlust [52, 53, 82]. Um die gewünschten Effekte der 5-ARI zu erzielen, ist eine dauerhafte Einnahme nötig [52]. Ihre Wirkung entfalten die 5-ARI besonders bei großem Prostatavolumen und hohem PSA-Wert [52, 53]. Es gilt, speziell bei präventiven PSA-Wert-Bestimmungen, zu beachten, dass sich unter Dauertherapie mit 5 α -Reduktase-Inhibitoren der PSA-Wert halbiert [52, 53].

1.5.2.3 *Muskarinrezeptorantagonisten (MRA)*

Viele Patienten mit BPS klagen über LUTS aufgrund einer überaktiven Blase (overactive bladder, OAB), welche sich in Nykturie, Pollakisurie und imperativem Harndrang äußern [52, 53, 83]. Zur Therapie dieser Symptomatik werden neben der Verhaltenstherapie vor allem Muskarinrezeptorantagonisten (MRA) wie z. B. Tolterodin oder Fesoterodin eingesetzt [52, 83]. Von den fünf verschiedenen Muskarinrezeptoren (M1-M5) im menschlichen Organismus sind für die Detrusoraktivität lediglich die Rezeptoren M2 und M3 von Bedeutung [53]. Durch die Hemmung dieser Rezeptoren mit MRA werden die über Acetylcholin vermittelte Kontraktion des M. detrusor vesicae gehemmt, Kontraktionen der Blasenwand reduziert und damit die Symptomatik verbessert [52, 53].

Häufige Nebenwirkungen bei Behandlung mit MRA sind Schwindel, Obstipation, Mundtrockenheit oder Pharyngitis [52, 53]. Ob die Gefahr eines akuten Harnverhalts durch die Einnahme von Muskarinrezeptorantagonisten erhöht ist, wird unterschiedlich beurteilt [52, 53, 83, 84]. Trotzdem ist weiterhin Vorsicht bei Patienten mit Blasenauslassobstruktion (BOO) geboten [52, 53].

1.5.2.4 *Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE-5-Inhibitoren)*

Stickstoffmonoxid (NO) wird aus L-Arginin gebildet [52, 53, 85]. Nach Diffusion in den Intrazellularraum führt es dort zur verstärkten Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) [52, 53, 85]. In der Folge kommt es, vermittelt durch cGMP, zu einer Relaxation der glatten Muskulatur [52, 53, 85]. Weil cGMP aber durch Phosphodiesterasen abgebaut wird, führt eine Hemmung

dieser Phosphodiesterasen, z. B. durch PDE-5-Inhibitoren, zu einer höheren intrazellulären Verfügbarkeit an cGMP und damit zu einer stärkeren Relaxation der glatten Muskulatur auch im unteren Harntrakt [52, 53, 85]. Tadalafil ist der einzige für die Behandlung von LUTS bei Männern zugelassene PDE-5-Inhibitor [52, 53]. Es ist bei LUTS ähnlich effektiv wie α_1 -Antagonisten und wirkt bereits nach einer Woche [52, 53, 86]. Im Gegensatz zu α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten sind die Patienten mit der Therapie zufriedener [52, 53, 86]. Dies liegt womöglich an den positiven Auswirkungen, welche PDE-5-Inhibitoren auf eine eventuell vorhandene erektile Dysfunktion haben [52, 86]. Positive Auswirkungen auf das Prostatavolumen oder eine geringere Rate an akuten Harnverhalten konnte bislang nicht gezeigt werden [52, 53, 87]. Es liegen aber auch noch keine Langzeitergebnisse aus Studien vor [52, 53, 87]. Eingesetzt werden sollte Tadalafil v. a. bei jüngeren, schlanken Männern mit starken Symptomen [52]. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Kopfschmerzen, spontanes Wärmegefühl sowie Verdauungsstörungen [52].

1.5.2.5 *Phytotherapeutika*

Phytotherapeutika sind, obwohl sie meist nicht von den Krankenkassen erstattet werden, in vielen Ländern sehr beliebt [58, 88-90]. Dies ist möglicherweise auf die einfachere Verfügbarkeit gegenüber herkömmlichen Medikamenten zurückzuführen. Trotz vieler Studien ist die Wirksamkeit der meisten Phytotherapeutika für die Behandlung der BPH aber nicht hinreichend belegt [88]. Weiterhin ist nicht geklärt, welche der in-vitro gezeigten Mechanismen im Endeffekt für mögliche klinische Wirkungen der Phytotherapeutika verantwortlich sein könnten [88]. Für Präparate der Sägepalme (*Serenoa repens*) gibt es am ehesten Hinweise auf eine positive Wirkung bei gleichzeitig guter Verträglichkeit [88-90]. Die einzelnen Präparate von *Serenoa repens* unterscheiden sich zwischen den Herstellern jedoch in ihrer Zusammensetzung und damit auch in ihrer Wirksamkeit zum Teil deutlich [57, 89]. Um den Einsatz von Phytotherapeutika bei BPH abschließend beurteilen zu können, müssen weitere qualitativ hochwertige Studien folgen [88, 90].

1.5.2.6 Kombinationstherapien

Kombinationstherapien dienen dazu, die positiven Wirkungen zweier Wirkstoffgruppen gleichzeitig zu nutzen [52]. Häufig addieren sich dabei nicht nur die erwünschten, sondern auch die unerwünschten Wirkungen [52].

Die gleichzeitige Einnahme von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten und 5-ARI ist als Langzeittherapie aufgrund einer signifikanten Überlegenheit im Vergleich zur Behandlung mit nur einer der Wirkstoffgruppen zu empfehlen [52, 82, 91].

Eine Kombinationstherapie von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten und Muskarinrezeptorantagonisten führt gegenüber einer Monotherapie mit nur einer Substanz zu einer signifikanten Verbesserung der LUTS bei Männern mit Detrusorüberaktivität [52, 92].

Zu einer Kombinationstherapie von α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten und PDE-5-Inhibitoren liegen wegen unzureichender Studienqualität keine belastbaren Ergebnisse oder Empfehlungen vor [52].

1.5.3 Grenzen der aktuellen medikamentösen Therapieoptionen

Aktuell verfügbare Medikamente sind nur zur Behandlung milder bis moderater Symptome wirkungsvoll [1]. Deshalb sind durch die steigende Anzahl an Patienten mit schwerer Symptomatik immer mehr Patienten auf eine operative Therapie angewiesen [1].

Die medikamentöse Therapie wird von zwei Arzneimittelgruppen dominiert [1]. 5 α -Reduktase-Inhibitoren haben einen globalen Marktanteil von 23 %, α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten von 65 % [1]. Aufgrund ihrer sich ergänzenden Wirkmechanismen werden α -Blocker und 5-ARI häufig für eine Kombinationstherapie genutzt [74, 75]. Um eine bessere Wirksamkeit zu erzielen, werden so die positiven Effekte beider Wirkstoffgruppen kombiniert [57]. Ein entscheidender Nachteil dieser Kombinationstherapie ist die hohe Abbruchrate [73]. Sie liegt ein Jahr nach Therapiebeginn mit einer Kombinationstherapie von α -Blockern und 5 α -Reduktase-Inhibitoren bei bis zu 91 % [73]. Bei einer Monotherapie mit α -Blockern oder

5 α -Reduktase-Inhibitoren liegt die Abbruchrate hingegen bei 65 % bzw. 82 % [73]. Trotz der Popularität der α -Blocker bleibt ihre Effektivität begrenzt [50]. So gelingt eine Reduktion der subjektiven Symptomatik bzw. des IPSS durch α -Blocker um 30-50 % sowie eine Verbesserung des maximalen Harnstrahls Q_{\max} um 15-40 % [50]. Der Unterschied gegenüber Placebos ist dabei gering [50]. Während sich der IPSS um 10-34 % bessert, führen Placebos zu einer Q_{\max} -Verbesserung um bis zu 27 % [50]. Die Patientenzufriedenheit mit der medikamentösen Therapie ist begrenzt [75]. In Studien zeigte sich, dass in der Langzeitbetrachtung nur 55 % der mit Tamsulosin behandelten Patienten sowie 64 % der mit einer Kombinationstherapie von α -Blockern und 5 α -Reduktase-Inhibitoren behandelten Patienten zufrieden waren [75]. Hoch ist darüber hinaus auch die Zahl an Non-Respondern [76]. So bessert sich lediglich bei 65-70 % der Patienten der IPSS um mehr als 25 % [76].

Aufgrund dieser Probleme bzw. Grenzen der aktuellen medikamentösen Therapie sollen in dieser Arbeit neue Ansätze gefunden werden, wie vorzugsweise als medikamentöse Monotherapie Wachstum und Kontraktion der Prostata beeinflusst werden könnten.

1.6 Glattmuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata

1.6.1 Molekularer Kontraktionsmechanismus (Querbrückenzyklus)

Muskelbewegungen werden durch sogenannte Myosinquerbrücken, welche mit dünnen Aktinfilamenten interagieren, generiert [93]. Initial ist Myosin über eine Querbrücke im 45° Winkel an das Aktinfilament gebunden [93]. In Abwesenheit von ATP verbleibt die Myosinquerbrücke fest an Aktin gebunden [93]. Sobald ATP an das aktive Zentrum der Myosinquerbrücke bindet, kommt es zu einer sofortigen Loslösung vom Aktin [93]. Die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat durch die Myosin-ATPase führt dazu, dass sich die Myosin-Querbrücke in eine 90° Position begibt [93, 94]. In dieser Position bindet die Myosin-Querbrücke an das Aktinfilament [93]. Es kommt daraufhin zu einer Konformationsänderung, welche unter Abspaltung von ADP und Phosphat den *power stroke* hervorruft [93]. Nach dieser „Ruderbewegung“ ändert sich der

Winkel zwischen Myosinquerbrücke und Aktin wieder auf 45° und der ursprüngliche Aktin-Myosin-Komplex entsteht [93]. Unter ATP-Verbrauch werden so die Aktinfilamente an den Myosinfilamenten vorbeitransportiert [93].

Veränderungen des freien intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels stellen einen entscheidenden Mechanismus dar, der eine Kontraktion bzw. eine Relaxation glatter oder quergestreifter Muskelzellen auslöst [94]. Während eine Kontraktion quergestreifter Muskelzellen durch die Bindung von Ca^{2+} an Troponin ausgelöst wird, binden die Ca^{2+} -Ionen in glatten Muskelzellen an Calmodulin [94]. Dieser Calcium/Calmodulin-Komplex bindet an die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (*myosin light chain kinase*, MLCK), wodurch diese aktiviert wird [94]. Die MLCK phosphoryliert dann die regulatorische leichte Kette des Myosins (MLC20) [94]. Erst durch diese Phosphorylierung an Serin 19 ist es möglich, dass die oben beschriebene Myosin-ATPase ATP hydrolysiert und sich der Muskel wie beschrieben kontrahiert [94]. Fällt die Ca^{2+} -Konzentration ab, wird die MLCK deaktiviert [94]. Die MLC20 wird durch die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) dephosphoryliert [94]. Dadurch wird die Myosin-ATPase deaktiviert, wodurch es zur Relaxation kommt [94].

1.6.2 Regulation der glattemuskulären Kontraktion

Die Kontraktion glatter Muskelzellen kann über verschiedene Wege reguliert werden [94]. Bei der elektromechanischen Kopplung kommt es durch Aktionspotentiale zu einer direkten Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [94]. So führt eine Depolarisation der Muskelzellen zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und damit zu einem Ca^{2+} -Einstrom [94]. Die Ca^{2+} -Ionen binden an Calmodulin und lösen dann über die Aktivierung der MLCK, wie in Kapitel 1.6.1 beschrieben, eine Kontraktion aus [94]. Die pharmakomechanische Kopplung führt über verschiedene zelluläre Signalwege zu einer Kontraktion der Muskulatur [94]. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung der MLCK durch Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) [50, 94]. Ein anderer Weg ist die Modulierung der Ca^{2+} -Sensitivität der MLC Phosphorylierung [94]. Der Hauptmechanismus dieser Ca^{2+} -Sensibilisierung glatter Muskelzellen besteht in der Inhibierung der

Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) [95]. Die Kontraktion glatter Muskulatur ist also von der Aktivität der MLCK und der Aktivität der MLCP abhängig [50].

Kommt es zur Bindung eines Liganden (z. B. Noradrenalin) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor einer glatten Muskelzelle, werden die rezeptorgebundenen heterotrimeren G-Proteine aktiviert. Diese lösen sich daraufhin vom Rezeptor ab und dissoziieren in eine große α -Untereinheit sowie zwei kleinere zusammen verbleibende β - und γ -Untereinheiten [50]. Die G_α -Untereinheit aktiviert jene die Kontraktion vermittelnden Effektoren: die Phospholipase C (PLC) und die GTPase RhoA [50]. Die aktivierte PLC hydrolysiert in der Zellmembran befindliches phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) [50]. Es entstehen die Produkte IP_3 und Diacylglycerol (DAG) [50].

1.6.2.1 IP_3 -Kaskade

IP_3 bewirkt die Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen des sarkoplasmatischen Retikulums und damit einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [50]. In der Folge kommt es zu einer Depolarisation des Membranpotentials und zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle [50]. Diese Öffnung bewirkt einen massiven Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle [50]. Ca^{2+} bindet an Calmodulin und die MLCK wird aktiviert [50]. Die Phosphorylierung der MLC20 führt letztlich zur Kontraktion [50].

Auch DAG kann über einen Signalweg eine Kontraktion vermitteln [50]. Dieser Weg wird im Folgenden zusammen mit dem durch die GTPase RhoA vermittelten Signalweg beschrieben. Weil es durch diese Mechanismen bei gleichbleibendem Ca^{2+} -Spiegel zu einer Kontraktion glatter Muskulatur kommt, wird dafür der Begriff Ca^{2+} -Sensibilisierung verwendet [50].

1.6.2.2 Ca^{2+} -Sensibilisierung

Die Phosphorylierung der MLC20, und damit die Kontraktion im glatten Muskel, findet nicht nur über die oben beschriebene Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels und der damit verbundenen Aktivierung der MLCK durch Calmodulin statt [95]. Auch die Inhibierung der MLCP führt bei gleichbleibendem Ca^{2+} -Spiegel zu einer verstärkten Phosphorylierung bzw. Kontraktion [95]. Vermittelt wird diese Inhibierung über zwei voneinander unabhängige Mechanismen, nämlich über den RhoA/Rho-Kinase-Signalweg sowie über DAG, einem Second Messenger der PLC-Kaskade [95]. Sie werden im Folgenden erläutert:

Neben IP_3 führt auch das andere Hydrolyseprodukt von PIP_2 , DAG, zum Ablauf einer Signalkaskade [50]. DAG aktiviert unterschiedliche Isoformen der Proteinkinase C (PKC) [50]. Die Proteinkinase C inhibiert die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase über zwei verschiedene Mechanismen [50]: durch Phosphorylierung und Aktivierung des Inhibitors CPI-17 oder durch direkte Phosphorylierung [50, 95]. Diese Inhibierung der MLCP führt zu einer verstärkten Phosphorylierung der MLC20 und damit zur Kontraktion [50].

Eine zentrale Rolle für die Ca^{2+} -Sensibilisierung spielt unabhängig davon zudem der RhoA/Rho-Kinase-Signalweg [95]. Nach Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins aktiviert dessen G_α -Untereinheit die GTPase RhoA [50]. RhoA aktiviert eine Serin/Threonin-Kinase, die Rho-Kinase, die dann die MLCP phosphoryliert und damit inaktiviert [95]. Dies hat wiederum eine verstärkte Phosphorylierung der MLC20, und damit eine Kontraktion, zur Folge [50].

1.6.3 α_1 -Adrenozeptoren in der Prostata

α_1 -Adrenozeptoren sind G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren [48]. Sie alle binden den Neurotransmitter Noradrenalin und vermitteln dadurch die Wirkungen des Sympathikus an der Zielzelle [48]. Es existieren drei verschiedene Subtypen an α_1 -Adrenozeptoren: (α_{1a} , α_{1b} , α_{1d}) [51]. Sie unterscheiden sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften, ihrer Struktur sowie möglicherweise in der Bildung von nachgeschalteten Second Messengern [51]. Jeder dieser α_1 -Adrenozeptorsubtypen kommt auch in der

Prostata vor [50]. Mit 70 % ist der α_1 a-Adrenozeptor der vorherrschende Subtyp im Stroma der humanen Prostata [50]. Im Vergleich zu normalem Prostatagewebe, ist in hyperplastischem Gewebe der Anteil an α_1 a-Rezeptoren, bei geringerem Anteil an α_1 d-Rezeptoren, erhöht [50]. In Studien konnten die verschiedenen Subtypen mittels immunhistochemischer Untersuchungen einzelnen Bereichen in der Prostata genauer zugeordnet werden [50]. Während die Immunreaktivität der α_1 d-Rezeptoren vor allem in intraprostatischen Gefäßen lokalisiert war, wurde im Drüsenepithel fast ausschließlich eine Aktivität der α_1 b-Rezeptoren festgestellt [50]. Im Stroma fand sich hauptsächlich der α_1 a-Rezeptor [50]. Unter Verwendung von verschiedenen Agonisten und Antagonisten mit jeweils unterschiedlicher Selektivität für die einzelnen Subtypen konnte in Organbadversuchen gezeigt werden, dass der α_1 a-Rezeptor für die glattemuskuläre Kontraktion in der humanen Prostata verantwortlich ist [50].

Bindet Noradrenalin postsynaptisch an α_1 a-Adrenozeptoren der glatten Muskelzellen im Stroma der Prostata, werden diese aktiviert [50]. Die Stimulation des Adrenozeptors bewirkt die Aktivierung rezeptorgebundener heterotrimerer G-Proteine, woraufhin es, entsprechend der oben beschriebenen Signalwege, zur Kontraktion kommt [50]

Auch für die α -adrenerge Kontraktion ist dabei ein erhöhter MLC Phosphorylierungsgrad entscheidend [50]. Das kann entweder durch Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase infolge erhöhter Ca^{2+} -Konzentration oder durch Inhibierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase bei gleichbleibendem Ca^{2+} -Spiegel (Ca^{2+} -Sensitisierung) geschehen [50, 95].

1.6.4 Thromboxan A₂

Thromboxan A₂ (TXA₂) ist bekannt für seine Wirkungen bei der Vasokonstriktion sowie bei der Aktivierung der Plättchenaggregation [96, 97]. Darüber hinaus vermittelt Thromboxan aber auch zahlreiche weitere Prozesse im Körper und zeigt beispielsweise einen mitogenen Effekt auf glatte Muskelzellen [96]. Studien haben gezeigt, dass TXA₂ nicht nur in glatter Gefäßmuskulatur, sondern auch in zahlreichen anderen glatten Muskelzellen Kontraktionen

auslösen kann [97]. Demnach kann in den Bronchien, im Darm, im Uterus, in der Harnblase und, wie aktuelle Studien zeigen, auch in der Prostata eine Kontraktion durch TXA₂ bzw. TXA₂-Rezeptor-Agonisten hervorgerufen werden [97, 98].

TXA₂ entsteht aus Arachidonsäure [96]. Diese wird zunächst durch die Cyclooxygenase (COX) zu Prostaglandin G₂ (PGG₂) und über die Peroxidase zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgewandelt [96]. Die Thromboxan-Synthase (TXS) katalysiert dann den Schritt zur Bildung von TXA₂ [96]. Wegen der kurzen Halbwertszeit von 32 Sekunden eignet sich TXA₂, welches in das stabile, aber biologisch inaktive Thromboxan B₂ zerfällt, nicht besonders gut für In-vitro-Versuche [96, 98]. Es wird daher für solche Zwecke häufig der stabile synthetische TXA₂-Rezeptor-Agonist U46619 verwendet [98]. Dieser vermittelt seine Wirkung genau wie TXA₂ über TXA₂-Rezeptoren [96, 98].

Strittmatter et al. konnten zeigen, dass in der humanen Prostata durch TXA₂ bzw. durch U46619 die gleichen Kontraktionsmechanismen ausgelöst werden können wie durch Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren [98]. Tatsächlich handelt es sich bei den TXA₂-Rezeptoren, genau wie bei den α_1 -Adrenozeptoren, um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [50, 96, 97]. Auch sie vermitteln ihre Wirkung über G α_q - und G $\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten sowie über die damit verbundenen Signalwege [50, 96-98].

1.6.5 Endotheline

Die Endotheline umfassen eine Gruppe von drei verschiedenen Isopeptiden: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) [99-101]. Ursprünglich entdeckt wurden die Endotheline aufgrund der stark vasokonstriktorisches Wirkung von ET-1 [99, 100, 102]. Sie haben zahlreiche biologische Effekte und bewirken unter anderem in den Atemwegen, dem Verdauungstrakt sowie in der Prostata eine Kontraktion glatter Muskulatur [99, 101]. Es konnte auch eine mitogene Wirkung der Endotheline, mitunter auf Fibroblasten, gezeigt werden [103]. Vermittelt werden die Effekte auf die Zielzellen über Endothelinrezeptoren an der Oberfläche dieser Zellen [99]. Anhand der Bindungsaffinität der Rezeptoren zu den Endothelinen können drei

verschiedene Endothelinrezeptoren unterschieden werden: ET_A, ET_B, ET_C [99, 100]. Alle Endothelinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [99, 100].

In der humanen Prostata existieren die Rezeptorsubtypen ET_A und ET_B, wobei der Anteil an ET_A-Rezeptoren überwiegt [104]. ET-1 löst über diese Rezeptoren eine mit α_1 -Adrenozeptor-Agonisten vergleichbar starke Kontraktion der glatten Muskulatur in der Prostata aus [104].

1.7 Ghreline

Ghrelin ist ein hauptsächlich im Magen gebildetes metabolisch wirksames Peptidhormon [105]. Es ist per Definition an Position 3 acetyliert, wird in der Literatur aber trotzdem oft als acyl-Ghrelin bezeichnet [106]. Davon zu unterscheiden ist desacetyliertes bzw. unacetyliertes Ghrelin, abgekürzt UAG [106].

Bekannt ist, dass Ghrelin seine Wirkung über den Ghrelinrezeptor GHS-R1a (*growth hormone secretagogue receptor 1a*) vermittelt [106]. Es wird jedoch vermutet, dass Ghrelin auch über weitere, noch unbekannte Rezeptoren wirken kann [106].

Der GHS-R1a ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor [106]. Je nach Zelltyp können bei Stimulation dieses Rezeptors durch einen Liganden unterschiedliche Signalwege über G-Proteine aktiviert werden [106, 107]. Dabei ist speziell die Kopplung von G-Proteinen mit G_{αq}-Untereinheit von Bedeutung [106]. Durch die Aktivierung der Phospholipase C kommt es analog zur Kontraktion glatter Muskelzellen über Inositolphosphat zur Ca²⁺-Ausschüttung [106].

Die Expression des GHS-R1a ist in der Hypophyse am höchsten [106]. Eine Stimulation des Rezeptors durch den Liganden Ghrelin bewirkt dort eine Ausschüttung von Growth Hormone (GH) [105, 106, 108]. Im Gegensatz zu Ghrelin ist UAG am GHS-R1a nahezu inaktiv [106]. In zahlreichen Studien wurden in den letzten Jahren die Effekte von neu entwickelten GHS-R1a-Agonisten sowie von Ghrelin getestet [106]. Sowohl in-vivo am

Patienten als auch in Tiermodellen führten Ghrelin und GHS-R1a-Agonisten zu erhöhter Muskel- und Fettgewebsmasse, verstärkter Nahrungsaufnahme und folglich zu Gewichtszunahme [106].

Als metabolisch wirksames Hormon steht Ghrelin im Verdacht, auch eine Rolle beim metabolischen Syndrom zu spielen [5]. Sowohl der appetitanregende Effekt als auch der die Zelldifferenzierung von Adipozyten stimulierende Effekt Ghrelins stehen aber dem Effekt von GH entgegen [108]. Als Ligand des GHS-R führt Ghrelin nämlich zur Ausschüttung von GH, eine höhere Ghrelin Sekretion würde dementsprechend zu einem geringeren Fettanteil führen [108].

Sowohl Ueberberg et al. als auch Gnanapavan et al. konnten außerhalb der Hypophyse den GHS-R1a in folgenden Organen finden: Gehirn, Rückenmark, Pankreas, Herz sowie Nebennieren [106, 109, 110]. Im Skelettmuskel sowie in Fett-, Brust- und Lebergewebe hingegen konnten sie den GHS-R1b nachweisen [106, 109, 110]. Dieser Rezeptor wurde auch in der Prostata vorgefunden, bindet aber kein acyl-Ghrelin [106, 109, 110]. Trotzdem zeigen Ghrelin und UAG in Geweben, in welchen der GHS-R1a nicht vorhanden ist, teilweise ähnliche Wirkung [106]. Dies lässt darauf schließen, dass es möglicherweise sogenannte GRLR (Ghrelin Receptor-Like Receptors) gibt [106]. Über solche GRLRs, welche nicht zwischen Ghrelin und UAG unterscheiden, könnten Effekte wie die Lipidakkumulation in Adipozyten, die Differenzierung von Myoblasten und Osteoblasten sowie auch die Konstriktion der Koronararterien vermittelt werden [106].

Wie bereits erwähnt, konnte in den vergangenen Jahren ein Zusammenhang zwischen dem metabolischen Syndrom und der Entwicklung bzw. der Progression BPH bedingter LUTS hergestellt werden [2]. Der Zusammenhang blieb aber bisher eher deskriptiv und es konnte bisher kein klarer Kausalzusammenhang abgeleitet werden [2]. Die Beobachtung, dass Ghrelin eine Konstriktion von Koronararterien auslösen kann, lässt die Vermutung zu, dass Ghrelin die glattmuskuläre Kontraktion in humanem Gewebe, und damit auch im unteren Harntrakt, beeinflussen könnte. Zusammen mit einer möglichen Rolle Ghrelins beim metabolischen Syndrom sind Auswirkungen von Ghrelin sowohl auf die statische als auch auf die dynamische Komponente des benignen Prostatasyndroms denkbar. Ghreline könnten also über noch unbekannte Mechanismen das metabolische Syndrom mit BPH bedingen

LUTS verbinden. Mögliche Zusammenhänge wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dazu wurden die beiden Ghrelin Rezeptor Agonisten L-692,585 (siehe Abbildung 1) und MK 0677 (siehe Abbildung 2) eingesetzt.

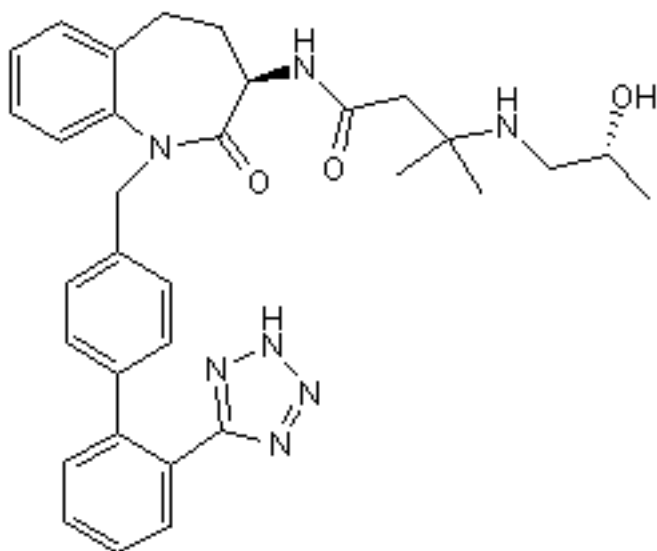


Abbildung 1: Strukturformel von 3-[[*(2R)*-2-Hydroxypropyl]amino]-3-methyl-*N*-[[*(3R)*-2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-1-[[2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)]1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-1*H*-1-benzazepin-3-yl]-butanamide (**L-692,585**) [111].

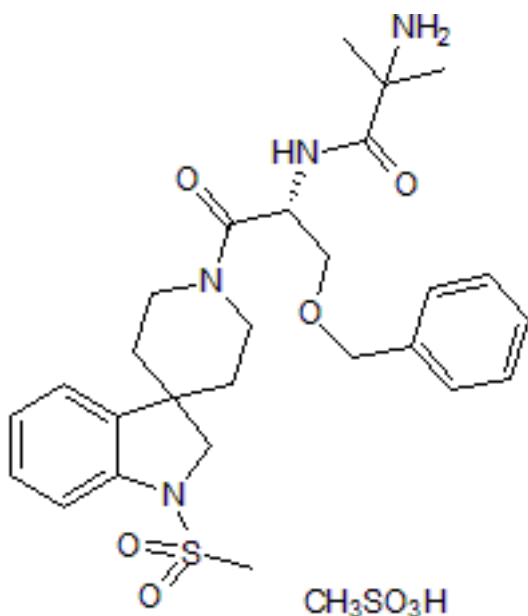


Abbildung 2: Strukturformel von 2-Amino-*N*-[[*(1R)*-2-[1,2-dihydro-1-(methylsulfonyl)spiro[3*H*-indole-3,4'-piperidin]-1'-yl]-2-oxo-1-[[phenylmethoxy)methyl]ethyl]-2-methylpropanamide methanesulfonate (**MK 0677**) [112].

2. Ziele der Arbeit

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Ghrelin eine Vasokonstriktion von Koronararterien, und damit von glatten Muskelzellen, auslösen kann [6, 7, 106]. Für Miktionsbeschwerden ist unter anderem ein erhöhter glattemuskulärer Tonus im unteren Harntrakt verantwortlich. Es wäre deshalb denkbar, dass Ghrelin bei der Entstehung von Miktionsbeschwerden eine Rolle spielt, indem es den Tonus in der glatten Muskulatur der Prostata verstärkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob es durch die Ghrelin Agonisten L-692,585 sowie MK 0677 zu einer Verstärkung der Kontraktion von humanem Prostatagewebe kommt.

Durch die Versuche sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

- Verstärkt L-692,585 eine neurogene Kontraktion?
- Verstärkt L-692,585 eine durch Noradrenalin induzierte Kontraktion?
- Verstärkt MK 0677 eine durch Phenylephrin induzierte Kontraktion?
- Verstärkt L-692,585 eine durch Endothelin-1 induzierte Kontraktion?
- Verstärkt L-692,585 eine durch U46619 induzierte Kontraktion?
- Kommt der GHS-Rezeptor in humanem Prostatagewebe vor?
- In welchen Bereichen kommt der GHS-Rezeptor in der Prostata vor?
- Gibt es individuelle Unterschiede in der GHS-Rezeptor-Expression zwischen den Patienten?
- Wie verhält sich die GHS-Rezeptor-Expression zu dem Grad der benignen Prostata Hyperplasie?

3. Materialien und Methoden

3.1 Verwendetes Gewebe

Das in den Versuchen verwendete humane Prostatagewebe stammte aus Organen, welche bei radikalen Prostatektomien zur Therapie des Prostatakarzinoms in der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München-Großhadern entnommen worden waren. Vor Operationsbeginn wurden mehrere verschließbare Gläser mit Custodiol®-Lösung (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland) in den Operationssaal gebracht. Die Organe konnten somit sofort nach Entnahme und noch während der Operation in diese zur Protektion und Konservierung von Organen verwendete Lösung gegeben werden. Das Forschungslabor wurde vom OP-Personal umgehend über die Organentnahme informiert, um eine sofortige Bearbeitung des humanen Gewebes zu ermöglichen. Im Pathologischen Institut der LMU in München-Großhadern wurden die Organe vom ärztlichen Personal auf makroskopischen Tumorbefall hin untersucht. Hierzu wurde ein von der Prostatakapsel bis zur Urethra reichender Längsschnitt vorgenommen. Nur wenn die periurethrale Zone der Prostata makroskopisch tumorfrei war, wurden daraus Gewebestücke für diese Arbeit entnommen. Im Anschluss an die Entnahme wurde das Gewebe sofort wieder in Custodiol®-Lösung eingelegt. War die periurethrale Zone aufgrund einer ablativen Voroperation stark beschädigt, wurde kein Gewebe entnommen. Das Restorgan verblieb nach Gewebeentnahme, in Formaldehyd eingelegt, am pathologischen Institut.

Zusammensetzung Custodiol® [113]:

0,8766 g Natriumchlorid
0,6710 g Kaliumchlorid
0,8132 g Magnesiumchlorid x 6 H₂O
3,7733 g Histidinhydrochlorid x H₂O
27,9289 g Histidin
0,4085 g Tryptophan

5,4651 g Mannitol

0,0022 g Calciumchlorid x 2 H₂O

0,1842 g Kaliumhydrogen-2-Oxopentandioat

(Wirksame Bestandteile 1000 ml Lösung [113])

Die Verwendung der humanen Gewebestücke für die Forschungszwecke dieser Arbeit erfolgte anonymisiert. Entsprechend dem zugehörigen Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität wurden im Rahmen des Projektes keine personenbezogenen Daten verwendet, aufbewahrt, oder analysiert.

3.2 Kraftmessungen im Organbad

3.2.1 Versuchsaufbau

Für die myografischen Messungen in der vorliegenden Arbeit wurde das Organbadsystem DMT 720M (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dänemark) verwendet. Das Gerät hat vier beheizbare Kammern mit Gasversorgung. Der Querschnitt einer dieser vier Organbadkammern mit einem Fassungsvermögen von jeweils 10 ml ist in Abbildung 3 dargestellt. In jeder Kammer kann zwischen zwei gegenüberliegenden Pins bzw. kleinen Spießen ein Gewebestück befestigt werden. Ein Pin ist starr und mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der andere Pin kann über eine Stellschraube als Längengeber justiert werden. Es ist dadurch möglich, den Abstand zwischen den beiden Pins zu regulieren. Kontrahiert sich das Gewebe zwischen den beiden Pins, kann die dabei entstehende Kraft über den Kraftaufnehmer bzw. Sensor am Pin gemessen werden.

Das Gerät wurde über einen Analog-Digital-Wandler (PowerLab 4/30, ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) mit einem Computer verbunden. Die auf dem PC installierte Software Labchart (Version 5.2, ADInstruments, Dunedin, Neuseeland) ermöglichte die Darstellung der vom Gerät gemessenen Kraftentwicklung in Abhängigkeit von der Zeit. Die dabei aufgezeichneten

Kontraktionskurven wurden nach Abschluss des jeweiligen Organbadversuchs auf dem Computer gespeichert und ausgewertet.

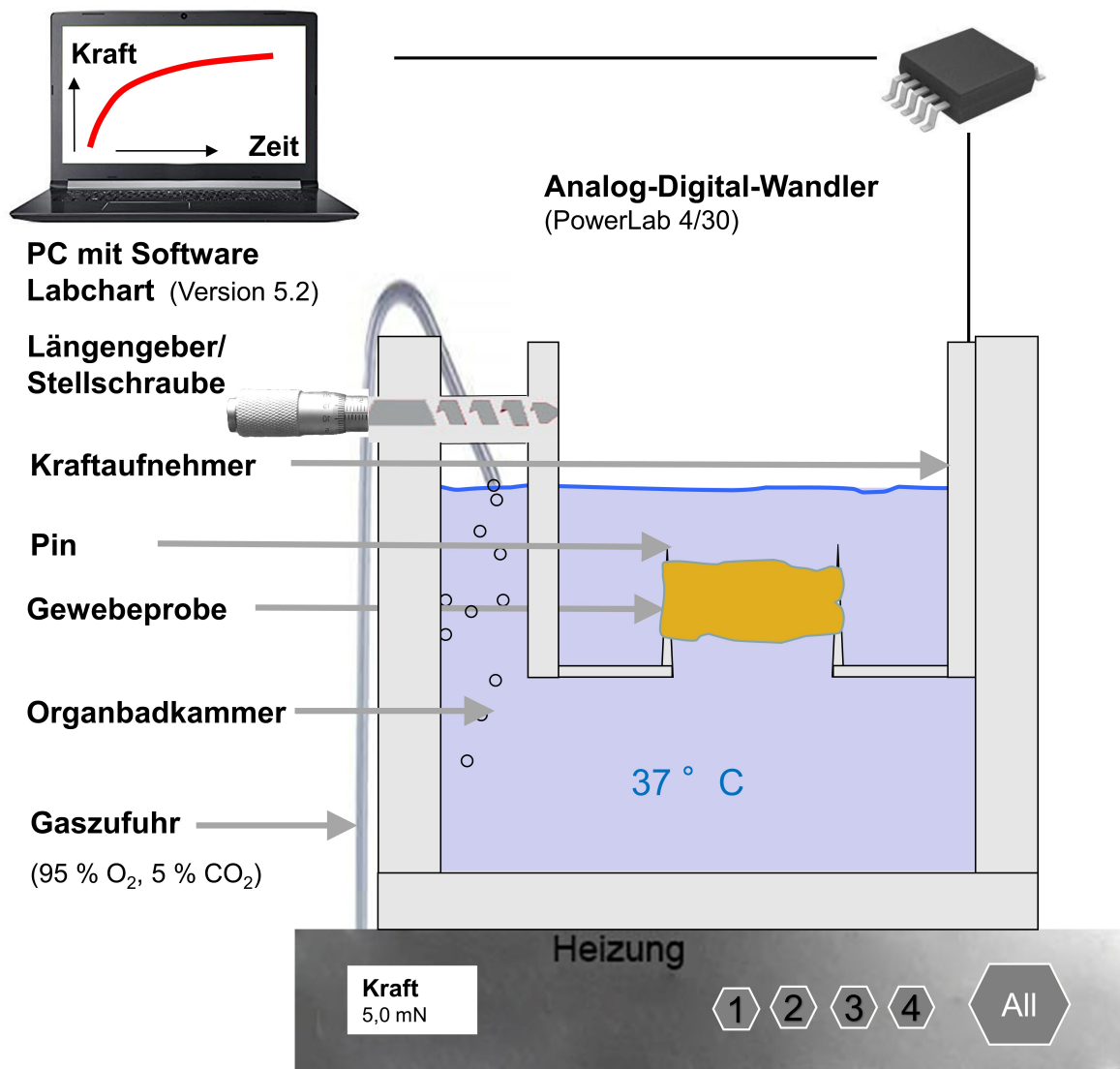


Abbildung 3: Skizze Versuchsaufbau Organbadversuch.

3.2.2 Versuchsablauf

Alle vier Organbadkammern wurden vor Versuchsbeginn mit jeweils 10 ml 37 °C warmer Krebs-Henseleit-Organbadlösung (KH-Lösung) befüllt. Diese Organbadlösung wurde täglich aus den Krebs-Henseleit-Stammlösungen-1 und -2 hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der Lösungen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Lösungen Organbadversuch.

Lösung	Zusammensetzung 1000 ml Lösung	
Krebs-Henseleit-Stammlösung-1	172,5 g	Natriumchlorid
	8,75 g	Kaliumchlorid
	9,36 g	Calciumchlorid x 2 H ₂ O
	4,05 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	7,34 g	Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O
	ad 1000 ml	destilliertes Wasser
Krebs-Henseleit-Stammlösung-2	52,5 g	Natriumhydrogencarbonat
	ad 1000 ml	destilliertes Wasser
Krebs-Henseleit-Organbadlösung	40 ml	Krebs-Henseleit-Lösung-1
	1,5 g	Glucose
	40 ml	Krebs-Henseleit-Lösung-2
	920 ml	destilliertes Wasser

Die Heizung der Organbadkammern wurde auf 37 °C eingestellt und die Gasversorgung aufgedreht, sodass jede Kammer mit Carbogen Gas (95 % O₂, 5 % CO₂) versorgt wurde und die Organbadlösung etwa Körpertemperatur hatte. Im Anschluss wurden frisch aus dem Operationssaal erhaltene und einheitlich auf 5 x 3 x 3 mm zurechtgeschnittene Gewebestreifen in den Kammern des Organbadsystems befestigt. Dazu wurde pro Kammer je ein Gewebestreifen der gleichen Prostata mit Hilfe zweier Pinzetten auf die beiden Pins geschoben. Nach Einbau der Gewebestreifen wurde eine Verbindung zum Computer hergestellt und die Software Labchart gestartet. Zunächst wurde der Kraftsensor am Organbad auf 0 gestellt. Um das Gewebe passiv vorzuspannen, wurde nun über die Stellschrauben eine Kraft von 5 mN auf jeden Gewebestreifen ausgeübt. Der Tonus fiel daraufhin häufig mehrmals spontan ab. Die Vorspannung wurde deshalb nach 15 und 30 Minuten wiederholt. Blieb der Tonus nach dieser Äquilibrationsphase stabil, so wurde dieser Wert als „Basislinie 1“ bezeichnet.

Im Anschluss daran wurden in jede Kammer 400 µl einer 2-molaren Kaliumchlorid-Lösung gegeben, um eine Kontraktion zu induzieren. Kontrahierte sich das Gewebe in einer Kammer nicht, wurde die Gewebeprobe entsorgt und nicht für den eigentlichen Versuch verwendet. Der maximale Kontraktionszustand wurde erreicht, sobald die durch eine Kurve am Computer visualisierte Kraft nicht weiter zunahm. Dieser Wert diente als Referenzwert für die spätere Auswertung. Anschließend wurden die Organbadkammern dreimal mit 37 °C warmer Krebs-Henseleit-Organbadlösung gespült. Das Kaliumchlorid wurde auf diese Weise entfernt. Nach etwa 10 Minuten Wartezeit wurde mit der eigentlichen Versuchsdurchführung begonnen. In zwei Kammern wurde randomisiert ein GHS-Rezeptor-Agonist zugefügt, die anderen beiden Kammern dienten als Kontrolle. Verwendet wurde dabei das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), in welchem die GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 bzw. MK 0677 gelöst wurden. Dieses wurde im gleichen Volumen appliziert wie die den GHS-Rezeptor-Agonisten enthaltende Lösung. Konnte das Gewebe in einer Kammer nicht für den Versuch verwendet werden, wurde der GHS-Rezeptor-Agonist nur in eine Kammer appliziert und die beiden anderen als Kontrolle verwendet. Alle Kammern wurden 30 Minuten inkubiert und der dann vorliegende Kontraktionszustand als „Basislinie 2“ bezeichnet.

In jeder Versuchsreihe wurden im Anschluss an die Inkubation Gewebekontraktionen auf unterschiedliche Weise ausgelöst. Eine kurze Übersicht der Vorgehensweise ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht Versuchsreihen.

Reihe	Ursache Gewebekontraktion
1	Effekte von L-692,585 auf durch EFS induzierte Kontraktion
2	Effekte von L-692,585 auf durch Noradrenalin induzierte Kontraktion
3	Effekte von MK 0677 auf durch Phenylephrin induzierte Kontraktion
4	Effekte von L-692,585 auf durch Endothelin-1 induzierte Kontraktion
5	Effekte von L-692,585 auf durch U46619 induzierte Kontraktion

Aus dem beschriebenen Ablauf ergab sich das folgende, in Tabelle 3 dargestellte Versuchsprotokoll, das in allen Versuchsreihen (1-5) verwendet wurde.

Tabelle 3: Versuchsprotokoll Organbadversuch.

Protokoll
Einbringen des Gewebes in mit KH-Lösung (37 °C) gefüllte Organbadkammer
Zurücksetzen des Kraftsensors auf 0 mN
Vorspannen der Gewebestreifen auf 5 mN (alle 15 Minuten)
Ablesen „Basislinie 1“
Auslösen einer Kontraktion durch Applikation von 400 µl KCl (<u>2 M</u>),
Ablesen maximale Kontraktion
Spülen
Applikation der Ghrelin Agonisten L-692,585 oder MK 0677
30 Minuten Inkubation
Ablesen „Basislinie 2“
Auslösen der Kontraktion

3.2.2.1 Exkurs: Kontraktion durch KCl

Jede am Sensor im Organbad anliegende durch Muskelkontraktionen hervorgerufene Kraft wurde zunächst als absoluter Wert in der Einheit mN am Computer dargestellt.

Um die einzelnen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurden, nachdem der Wert für die „Basislinie 1“ notiert worden war, in jede Kammer 400 µl einer 2-molaren Kaliumchlorid-Lösung gegeben. Es wurde dadurch eine Kontraktion des Gewebes induziert. Auf den so erhaltenen Referenzwert konnten die später durch Agonisten oder elektrische Stimulation erzeugten Gewebekontraktionen bezogen werden.

Mögliche Unterschiede im verwendeten Prostatagewebe der einzelnen Patienten, wie eine unterschiedlich stark ausgeprägte BPH oder ein interindividuell unterschiedliches Verhältnis von Stroma zu Drüsengewebe, wurden somit ausgeglichen.

Die Zugabe der hochmolaren Kaliumchlorid-Lösung in die Organbadkammern führt über eine Depolarisation des Membranpotentials zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle der glatten Muskelzellen im Gewebe [114]. In der Folge kommt es durch Ca^{2+} -Einstrom zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels [94, 114]. Die Ca^{2+} -Ionen binden an Calmodulin und lösen dann über die Aktivierung der MLCK wie in Kapitel 1.6 beschrieben eine Kontraktion aus [94]. Somit kommt es zu Rezeptor-unabhängigen Kontraktionen, deren Ausmaß allein vom Anteil an glatter Muskulatur in der Gewebeprobe abhängt.

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Auslösung der Gewebekontraktion genauer erklärt. Mit Hilfe des Programms Labchart konnte jeweils die maximale Kontraktion nach Applikation einer bestimmten Konzentration bzw. eines bestimmten elektrischen Impulses visualisiert und aufgezeichnet werden.

3.2.3 1. Versuch: Elektrische Feldstimulation (EFS) mit L-692,585

Für die elektrische Feldstimulation wurden nach Befestigung des Prostatagewebes spezielle Elektroden in die Organbadkammern eingebaut. Anschließend wurde nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll verfahren. Die gegenüberliegend positionierten Elektroden wurden mit einem Impulsgenerator in Verbindung gebracht. Dafür wurde der DMT CS4 Stimulator (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dänemark) verwendet. Das Gerät erzeugt definierte elektrische Impulse, welche über die Elektroden in die Organbadkammern geleitet wurden.

Folgende in Tabelle 4 aufgeführte Frequenzen wurden zeitgleich in allen vier Organbadkammern nacheinander angelegt.

Tabelle 4: Verwendete Frequenzen bei der elektrischen Feldstimulation.

Frequenz	2 Hz	4 Hz	8 Hz	16 Hz	32 Hz
-----------------	------	------	------	-------	-------

3.2.4 2. Versuch: Kontraktion durch Noradrenalin mit L-692,585

Zunächst wurde nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll verfahren.

Während der Inkubationsphase wurde eine Stammlösung mit einer Noradrenalin-Konzentration von 10 mM hergestellt. Hierfür wurden etwa 2 mg Noradrenalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) abgewogen und in der entsprechenden Menge destilliertem Wasser gelöst. Das zugegebene Volumen wurde so berechnet, dass sich mit der eingewogenen Menge Noradrenalin eine Konzentration von 10 mM ergab. Aus der 10 mM Noradrenalin enthaltenden Stammlösung wurden dann durch Verdünnung eine 1 mM und eine 0,1 mM Noradrenalin enthaltende Lösung hergestellt.

Zur Auslösung einer Gewebekontraktion wurde nach dem in Tabelle 5 dargestellten Pipettierschema verfahren.

Tabelle 5: Pipettierschema Noradrenalin.

Konzentration	0,1 mM	0,1 mM	1,0 mM	1,0 mM	10 mM	10 mM	10 mM
der jeweils							
verwendeten							
Lösung							
Appliziertes	10 µl	20 µl	7 µl	20 µl	7 µl	20 µl	70 µl
Volumen							
Konzentration	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	10 µM	30 µM	100 µM
im Organbad							
nach							
Applikation							

Die Noradrenalin-Konzentration in allen vier Organbadkammern wurde schrittweise von 0,1 μM auf 100 μM erhöht. Erst nach Erreichen der maximalen Gewebekontraktion durch eine bestimmte Konzentration an Noradrenalin wurde das für den nächsten Schritt nach Protokoll vorgesehene Volumen appliziert.

3.2.5 3. Versuch: Kontraktion durch Phenylephrin mit MK 0677

Zunächst wurde nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll verfahren.

Während der Inkubationsphase wurde eine Stammlösung mit einer Phenylephrin-Konzentration von 10 mM hergestellt. Hierfür wurden etwa 2 mg Phenylephrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) abgewogen und in der entsprechenden Menge destilliertem Wasser gelöst. Das zugegebene Volumen wurde so berechnet, dass sich mit der eingewogenen Menge Phenylephrin eine Konzentration von 10 mM ergab. Aus der 10 mM Phenylephrin enthaltenden Stammlösung wurden dann durch Verdünnung eine 1 mM und eine 0,1 mM Phenylephrin enthaltende Lösung hergestellt.

Zur Auslösung einer Gewebekontraktion wurde nach dem in Tabelle 6 beschriebenen Pipettierschema verfahren:

Tabelle 6: Pipettierschema Phenylephrin.

Konzentration der jeweils verwendeten Lösung	0,1 mM	0,1 mM	1,0 mM	1,0 mM	10 mM	10 mM	10 mM
Appliziertes Volumen	10 μl	20 μl	7 μl	20 μl	7 μl	20 μl	70 μl
Konzentration im Organbad nach Applikation	0,1 μM	0,3 μM	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM

Die Phenylephrin-Konzentration in allen vier Organbadkammern wurde schrittweise von 0,1 μM auf 100 μM erhöht. Erst nach Erreichen der maximalen Gewebekontraktion durch eine bestimmte Konzentration Phenylephrin wurde das für den nächsten Schritt nach Protokoll vorgesehene Volumen appliziert.

3.2.6 4. Versuch: Kontraktion durch U46619 mit L-692,585

Zunächst wurde nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll verfahren.

Während der Inkubationsphase wurde eine Stammlösung mit einer U46619-Konzentration von 10 mM hergestellt. Hierfür wurden 1 mg U46619 mit der entsprechenden Menge Ethanol (99 %) verdünnt. Aus der 10 mM U46619 enthaltenden Stammlösung wurden dann durch Verdünnung eine 1 mM und eine 0,1 mM U46619 enthaltende Lösung hergestellt.

Zur Auslösung einer Gewebekontraktion wurde nach dem in Tabelle 7 beschriebenen Pipettierschema verfahren:

Tabelle 7: Pipettierschema U46619.

Konzentration der jeweils verwendeten Stammlösung	0,1 mM	0,1 mM	1,0 mM	1,0 mM	10 mM	10 mM
Appliziertes Volumen	10 μl	20 μl	7 μl	20 μl	7 μl	20 μl
Konzentration U46619 im Organbad	0,1 μM	0,3 μM	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM

Die U46619-Konzentration in allen vier Organbadkammern wurde schrittweise von 0,1 μM auf 30 μM erhöht. Erst nach Erreichen der maximalen Gewebekontraktion durch eine bestimmte Konzentration U46619 wurde das für den nächsten Schritt nach Protokoll vorgesehene Volumen appliziert.

3.2.7 5. Versuch: Kontraktion durch Endothelin-1 mit L-692,585

Zunächst wurde nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll verfahren.

Während der Inkubationsphase wurde eine Stammlösung mit einer Endothelin-1-Konzentration von 0,4 mM hergestellt. Hierfür wurden 1 mg Endothelin-1 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) mit der entsprechenden Menge destilliertem Wasser verdünnt.

Zur Auslösung einer Gewebekontraktion wurde nach dem in Tabelle 8 beschriebenen Pipettierschema verfahren:

Tabelle 8: Pipettierschema Endothelin-1.

Konzentration der jeweils verwendeten Stammlösung	0,4 mM	0,4 mM	0,4 mM	0,4 mM
Appliziertes Volumen	2,5 µl	5,0 µl	17,5 µl	50 µl
Konzentration im Organbad nach Applikation	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM

Die Endothelin-1-Konzentration in allen vier Organbadkammern wurde schrittweise von 0,1 µM auf 3 µM erhöht. Erst nach Erreichen der maximalen Gewebekontraktion durch eine bestimmte Konzentration Endothelin-1 wurde das für den nächsten Schritt nach Protokoll vorgesehene Volumen appliziert.

3.3 Immunfluoreszenzfärbung

Nach Zuschnitt der Gewebeproben für die Organbadversuche wurden die Gewebestücke zunächst in Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound (Sakura Fintek Europe B.V., Alphen am Rhein, Niederlande) in Mikroreaktionsgefäße eingebettet. Das bei Raumtemperatur flüssige Einbettmedium wird bei niedrigen Temperaturen fest und ermöglichte so das Anfertigen von Gefrierschnitten. Die eingebetteten Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Mit Hilfe des Kyrostaten Leica CM3050 S (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden aus den gefrorenen Blöcken bei -23 °C Kammertemperatur 8 µm dünne Schnitte angefertigt und auf 20 °C warme Superfrost PlusTM Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) aufgebracht. Die Einbettmasse verflüssigt sich bei dieser Temperatur, sodass die Gewebeschnitte auf dem Objektträger fixiert wurden.

Im nächsten Schritt wurden die Objektträger mit den Geweben in eine vorgekühlte Küvette mit Methanol eingelegt und bei -20 °C 5 Minuten lang im Gefrierschrank nachfixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal wenige Minuten mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Lösung) (siehe Tabelle 9) gewaschen. Vor Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Schnitte geblockt. Hierfür wurden diese nach Entnahme aus der Küvette bei Raumtemperatur 40 Minuten in eine Inkubationskammer für Objektträger eingelegt und mit etwa 200 µl 1-prozentiger Rinderserumalbumin-Lösung (BSA-Blocklösung) (siehe Tabelle 9) inkubiert.

Tabelle 9: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern Immunfluoreszenz.

Lösung	Zusammensetzung	
PBS-Lösung	8,0 g	Natriumchlorid
	0,2 g	Kaliumchlorid
	1,42 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	0,27 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	ad 1000 ml	destilliertes Wasser
BSA-Blocklösung (1 %)	100 mg	Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
	10 ml	PBS Lösung
Sekundärantikörper- Lösung-1 (Cy5-haltig)	2 µl	ab6564 (Anti-Kaninchen) (Abcam, Cambridge, Großbritannien)
	998 µl	BSA-Blocklösung 1 %
Sekundärantikörper- Lösung-2 (Cy3-haltig)	2 µl	AP124C (Anti-Maus) (EMD Millipore, Billerica, USA)
	1 µl	4,6-Diamin-2-phenylindol (DAPI) (Invitrogen, Camarillo, CA, USA)
	997 µl	BSA-Blocklösung 1 %

Als Primärantikörper kamen die in Tabelle 10 vorgestellten Kaninchen Anti-GHS-Rezeptor-Antikörper sowie Maus Anti-Calponin-Antikörper zum Einsatz. Durch die Verwendung von Primärantikörpern zweier verschiedener Spezies konnte eine Doppelmarkierung durchgeführt werden. Beide Antikörper wurden mit 1-prozentiger BSA-Blocklösung gemäß Herstellerangaben verdünnt und nach Abkippen der 1-prozentigen BSA-Blocklösung auf die Objektträger aufgebracht. Um eine unspezifische Bindung von einer spezifischen Bindung der später applizierten Sekundärantikörper unterscheiden zu können, wurde stets ein Objektträger als Kontrolle verwendet. Hierfür wurde 1-prozentige BSA-Lösung ohne Antikörper auf die Schnitte pipettiert. Alle Objektträger wurden in eine dafür vorgesehene Inkubationskammer eingelegt und über Nacht bei Raumtemperatur in den antikörperhaltigen Lösungen inkubiert.

Vor Zugabe der Sekundärantikörper wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Eine Kontamination der Kontrollen durch die Primärantikörper wurde durch das Waschen in separaten Küvetten verhindert.

Um die spezifischen Bindungsstellen der Primärantikörper darstellen zu können, wurden als Sekundärantikörper die in Tabelle 11 aufgeführten Cyanin-3(Cy3)-konjugierten und gegen Maus Antigene gerichteten Antikörper der Ziege (AP124C) sowie die Cyanin-5(Cy5)-konjugierten und gegen Kaninchen Antigene gerichteten Antikörper der Ziege (ab6564) verwendet. Um auch die Zellkerne der Proben anfärben zu können, wurde zusätzlich der DNA spezifische Farbstoff 4,6-Diamin-2-phenylindol (DAPI) verwendet.

Zunächst wurde die Sekundärantikörperlösung-1, welche die Cy5-konjugierten Antikörper enthält, hergestellt (siehe Tabelle 9) und auf die Schnitte pipettiert. In einer dunklen Inkubationskammer wurden die Objektträger dann 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abkippen dieser Lösung und dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurde die zweite Sekundärantikörperlösung (siehe Tabelle 9) hergestellt und auf die Schnitte gegeben. Nach 45 Minuten Inkubation in Dunkelheit in dieser die Cy3-konjugierten Sekundärantikörper sowie den Farbstoff DAPI enthaltenden Lösung, wurden die Objektträger abgetropft und dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit 1-2 Tropfen CitiFluor™ AF1 Eindeckmedium (Citifluor Ltd. London, Großbritannien) eingedeckt und im Anschluss in dieser Form bei 5 °C in dafür vorgesehenen Mappen gelagert.

Mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops CLSM Leica TCS SP2 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden die fluoreszenzgefärbten Schnitte analysiert.

Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper Immunfärbung.

Zielstruktur bzw. Antigen	ID	Konjugation	Spezies	Klonalität	Hersteller
GHS- Rezeptor	orb323279	unkonjugiert	Kanin- chen	polyklonal	Biorbyt Ltd., Cambridge, Großbritannien
Calponin 1/2/3	sc-136987	unkonjugiert	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper Immunfärbung.

Zielstruktur bzw. Antigen	ID	Konjugation	Spezies	Klonalität	Hersteller
Kaninchen	ab6564	Cyanin-5	Ziege	polyklonal	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Maus	AP124C	Cyanin-3	Ziege	polyklonal	EMD Millipore, Billerica, USA

3.4 Western-Blot-Analysen

3.4.1 Homogenisation und Proteinbestimmung

Gewebestücke, welche nach Zuschchnitt der Gewebeproben für die Organbadversuche verblieben waren, wurden im gefrorenen Zustand mit Hilfe des FastPrep-24™ Systems (MP Biomedicals LLC, Santa Ana, CA, USA) homogenisiert. Hierzu wurden die Proben zusammen mit 500 µl eines

Lysepuffers in speziell dafür vorgesehene Lysing Matrix A enthaltende Röhrchen des FastPrep-24™ Systems gegeben.

Bestandteile Lysepuffer:

25 mM TRIS Hydrochlorid

10 µM Phenylmethansulfonylfluorid

1 mM Benzamidin

10 µg/ml Leupeptinhemisulfat

Die befüllten Röhrchen wurden im FastPrep-24™ System gemäß Herstellerangaben viermal 20 Sekunden unter Trockeneiskühlung im Homogenisationsgerät gerüttelt und anschließend bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden abpipettiert und in Mikroreaktionsgefäße gegeben.

120 µl des proteinhaltigen Überstandes wurden zusammen mit SDS-(sodium-dodecyl-sulfate-)haltigem Protein-Probenauftragspuffer (Roti®-Load 1, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) gemäß Herstellerangaben, nach einer Modifikation der ursprünglichen Formulierung nach Lämmli, 9 Minuten in Mikroreaktionsgefäßen bei 80-90 °C gekocht [115, 116]. Im Anschluss wurden die gekochten Proteine bis zu ihrer Verwendung für die folgende SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) bei -20 °C in Mikroreaktionsgefäßen gelagert.

Der Rest des Überstandes wurde für die Proteinbestimmung verwendet. Diese wurde mit Hilfe des DC Protein Assay Kits (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nach Herstellerangaben, entsprechend einer modifizierten Proteinbestimmung nach Lowry, durchgeführt [117, 118].

3.4.2 SDS-PAGE

Um die Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße auftrennen zu können, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt [115].

Für die Herstellung der dafür nötigen Gele (siehe Tabelle 12) wurden je eine Glasplatte mit 0,75 mm Abstandshalter (Spacer) sowie die dazu gehörige kurze Glasplatte (beides Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in dafür vorgesehene Gel-Gießrahmen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eingebaut und auf eine ebene Fläche gestellt.

Tabelle 12: Zusammensetzung Gele und Gelpuffer.

Lösung		Zusammensetzung	
Trenngel		12,6 ml	Acrylamid 4K-Lösung (30 %)
		12,6 ml	destilliertes Wasser
		8,44 ml	Trenngelpuffer
		112,5 µl	APS
		22,5 µl	TEMED
Sammelgel		3,24 ml	Acrylamid 4K-Lösung (30 %)
		7,92 ml	destilliertes Wasser
		3,75 ml	Sammelgelpuffer
		75 µl	APS
		15 µl	TEMED
Trenngelpuffer	<i>(pro 1000 ml)</i>	181,71 g	TRIS Base (1,5 M)
		20 ml	SDS-Fertiglösung (20 %)
Sammelgelpuffer	<i>(pro 1000 ml)</i>	78,8 g	TRIS Hydrochlorid (0,5 M)
		20 ml	SDS-Fertiglösung (20 %)

Zunächst wurde jeweils Trenngel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Um einen gleichmäßig horizontalen Gelspiegel zu erreichen, wurde im

Anschluss destilliertes Wasser auf das Trenngel pipettiert und erst nach Aushärtung abgegossen.

Nach Aushärtung des Trenngels wurde Sammelgel zwischen die Glasplatten auf das Trenngel pipettiert. Um die für die spätere Befüllung wichtigen Probenfächer zu erhalten, wurde jeweils ein Kamm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit zehn Zacken zwischen die Glasplatten gesteckt und bis zur Aushärtung des Sammelgels darin belassen.

Nach Aushärtung wurden die nun durch das Gel verbundenen Glasplatten aus dem Gießrahmen ausgebaut und den Herstellerangaben entsprechend mit Hilfe der dafür vorgesehenen Vorrichtung in die Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) eingebaut. Diese wurde anschließend mit Laufpuffer (siehe Tabelle 13) gefüllt.

Tabelle 13: Zusammensetzung Laufpuffer.

Lösung	Zusammensetzung pro 1000 ml	
Laufpuffer-Stammlösung	30,3 g	TRIS Base (250 mM)
	142,6 g	Glycin
	50 ml	SDS-Fertiglösung (20 %)
	ad 1000 ml	destilliertes Wasser
Laufpuffer (gebrauchsfertig)	100 ml	Laufpuffer-Stammlösung
	900 ml	destilliertes Wasser

Um später das Molekulargewicht der Proteinbanden einordnen zu können, wurden in eine der äußeren Probenfächer 5 µl eines Markers (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gegeben, in die anderen Probenfächer wurden je 20 µg Protein einer Gewebeprobe pipettiert. Anschließend wurde die Kammer geschlossen. Unter einer Spannung von 200 V wurden die Proben 90 Minuten ihrer Molekülgröße entsprechend aufgetrennt.

3.4.3 Western-Blot

Parallel zur Gelelektrophorese wurden eine Nitrocelluloselösung (NC-Lösung) sowie eine Gellösung hergestellt (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Zusammensetzung Transferpuffer Western-Blot.

Lösung	Zusammensetzung	
Puffer Western-Blot (4 x)	12,1 g	TRIS Base
	57,6 g	Glycin
	ad 1000 ml	destilliertes Wasser
Transferpuffer Gele (Gellösung)	250 ml	Puffer Western-Blot (4 x)
	700 ml	destilliertes Wasser
	5 ml	SDS-Fertiglösung (20 %)
Transferpuffer NC-Membran (NC-Lösung)	250 ml	Puffer Western-Blot (4 x)
	650 ml	destilliertes Wasser
	100 ml	Methanol

Für die Übertragung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine von den Gelen auf Nitrocellulosemembranen (NC-Membranen) (Amersham™ Protran™ Nitrocellulose Blotting membrane, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde ein Semi-Dry-Blot-System (Trans-Blot® SD Cell Bio-Rad, Hercules, CA, USA) verwendet. Zunächst wurden pro Gel eine auf die Größe eines Gels zugeschnittene NC-Membran sowie vier Filterpapiere in den NC-Transferpuffer eingelegt. Die Gele wurden von den Glasplatten abgelöst und anschließend in den Gel-Transferpuffer eingelegt. Für das Blotting wurden jeweils zwei Filterpapiere übereinander in die Blottingkammer des Semi-Dry-Blot-Systems gelegt. Auf diese Filterpapiere wurden erst je eine NC-Membran und dann ein Gel gelegt. So konnten die negativ geladenen Proteine nach unten zur positiven Anode wandern. Bedeckt wurde dieses

„blotting Sandwich“ von zwei weiteren in NC-Lösung eingelegten Filterpapieren. Insgesamt konnten vier „blotting Sandwiches“ gleichzeitig geblottet werden. Die Kammer wurde geschlossen und die Proteine wurden von den Gelen unter einer Spannung von 19 Volt innerhalb von 90 Minuten auf die Membranen übertragen.

Um unspezifische Bindungen der im späteren Verlauf des Versuchs verwendeten Antikörper an die NC-Membranen zu verhindern, wurden die Membranen nach Abschluss des Western-Blots geblockt, indem sie bei 4 °C über Nacht in eine Lösung aus 100 ml PBS-T und 5 g Milchpulver „Blotting-Grade“ (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) eingelegt wurden. Die Zusammensetzung dieser Blocklösung ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung Blocklösung.

Lösung	Zusammensetzung pro 1000 ml	
PBS-Lösung (20 x) (Phosphat buffered saline)	160 g	Natriumchlorid
	5,52 g	Natriumdihydrogenphosphat x H ₂ O
	57,28 g	Natriumhydrogenphosphat x 12 H ₂ O
	ad 1000 ml	destilliertes Wasser
PBS-T	50 ml	PBS (20 x) Lösung
	950 ml	destilliertes Wasser
	1 ml	Tween 20

Am nächsten Tag wurden die Membranen aus der Lösung entnommen und zweimal 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wurde, wie die weiteren Inkubations- und Waschvorgänge im Versuchsablauf, auf einem Taumelschüttler durchgeführt. Im Anschluss an den Waschvorgang wurden die mit den Proteinen beladenen Membranen 90 Minuten mit den verschiedenen Primärantikörpern inkubiert. Dafür wurde der jeweilige Primärantikörper gemäß Herstellerangaben mit 5 % Milchpulver enthaltender PBS-T-Lösung verdünnt. Es wurden die in Tabelle 16 aufgeführten Primärantikörper verwendet:

Tabelle 16: Primärantikörper Western-Blot.

Zielstruktur bzw. Antigen	ID	Spezies	Klonalität	Hersteller
Ghrelin-Rezeptor	orb323279	Kaninchen	polyklonal	Biorbyt Ltd., Cambridge, Großbritannien
Calponin 1/2/3	sc-136987	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
pan-Zytokeratin	sc-8018	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
PSA	sc-7316	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Beta-Aktin	sc-47778	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Nach dem Inkubieren wurden die Membranen viermal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen.

Für die Visualisierung der Primärantikörperbindungen wurde das Vectastain® ABC HRP Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet. Zunächst wurden spezielle biotinylierte Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper (BA-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) bzw. biotinylierte Ziegen-Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper (BA-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) im Verhältnis 1:200 in PBS gelöst und die Membranen

darin für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde das ABC-Reagenz des Vectastain Kits gemäß Herstellerangaben angesetzt und 30 Minuten in der dafür vorgesehenen Mischflasche belassen [119]. Durch das Mischen des avidinhaltigen A-Reagenz mit dem eine biotinylierte Meerrettichperoxidase enthaltenden B-Reagenz entstand ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex) [120].

Nach Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurden die Membranen viermal 5 Minuten mit PBS-T gewaschen. Es folgte eine anschließende 30-minütige Inkubation zusammen mit dem ABC-Komplex. Hierdurch wurden die biotinylierten Sekundärantikörper an den avidinhaltigen ABC-Komplex gebunden [120].

Nach Inkubation mit dem ABC-Komplex wurden die Membranen viermal jeweils 3 Minuten mit PBS-T gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Membranen 4 Minuten mit einer ECL-(enhanced chemiluminescence-)Lösung (siehe Tabelle 17) inkubiert und nach Entnahme aus der ECL-Lösung direkt mit transparenten Tageslichtprojektor-Folien bedeckt. In einer Autoradiographiekassette verpackt wurden die Membranen zur Belichtung und Entwicklung ins Fotolabor gebracht.

Tabelle 17: Zusammensetzung Lösungen Chemilumineszenz.

Lösung	Zusammensetzung	
Lösung-A (SA)	200 ml	0,1 M TRIS Hydrochlorid
	50 mg	Luminol
Lösung-B (SB)	11 mg	para-Hydroxycoumarinsäure
	10 ml	DMSO
ECL-(enhanced chemiluminescence-)Lösung	10 ml	Lösung A
	1 ml	Lösung B
	3 µl	H ₂ O ₂ (30 %)

Verwendet wurde eine luminolhaltige ECL-Lösung. Durch das Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in der Lösung kam es in Anwesenheit der

Meerrettichperoxidase zur Oxidation von Luminol und in der Folge zur Emission von Licht [121, 122]. Im abgedunkelten Fotolabor wurden speziell dafür vorgesehene Filme (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in die Autoradiographiekassette gelegt und somit durch die Chemilumineszenz belichtet. Nach ausreichender Expositionszeit wurden sie anschließend in einem Röntgenfilm-Entwickler (Cawomat 2000 IR, CAWO Photochemische Fabrik GmbH, Schrobenehausen, Deutschland) entwickelt.

3.5 Auswertung und statistische Methoden

Zur Aufzeichnung der Kontraktionskurven wurde die Software Labchart verwendet. Während der Versuchsdurchführung erfolgte über diese Software eine Markierung der relevanten, in Tabelle 18 aufgeführten, Kontraktionszustände über eine Eingabezeile.

Tabelle 18: Zeitpunkte Bestimmung Kontraktionszustand.

-
- Basislinie 1
 - maximale Kontraktion nach Zugabe von KCl
 - Basislinie 2
 - maximale Kontraktion nach Durchführung einer EFS mit einer bestimmten Frequenz

oder

- maximale Kontraktion nach Zugabe einer bestimmten Konzentration von Noradrenalin, Phenylephrin, U46619 bzw. ET-1
-

Nach Bestimmung der Kontraktionszustände wurden die einzelnen Messwerte in das Programm Microsoft Excel exportiert.

Von den Messwerten, welche durch die Applikation einer bestimmten Konzentration von α -Agonisten, U46619, ET-1 bzw. durch EFS erzeugt wurden,

wurden für jede Konzentration bzw. Frequenz die Messwerte der „Basislinie 2“ abgezogen. Die resultierenden Werte wurden wiederum für jede Konzentration bzw. Frequenz durch einen Referenzwert dividiert. Bei diesem Referenzwert handelte es sich um die Differenz der Werte „Basislinie 1“ und des Wertes des maximalen durch Kaliumchlorid ausgelösten Kontraktionszustandes.

Der Quotient wurde mit 100 multipliziert. Der resultierende Wert drückt somit die Agonisten bzw. EFS-induzierte Kontraktion in Prozent der durch KCl induzierten Kontraktion aus. Auf diese Weise konnten relative Werte für Versuchs- und Kontrollgruppen für jeden einzelnen Versuch ermittelt werden.

Für jede Konzentration bzw. Frequenz wurde mit Excel anschließend der Mittelwert aller Versuche einer Versuchsreihe gebildet. Aus dem jeweiligen Mittelwert wurde mit Hilfe von Excel außerdem der jeweilige Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) berechnet. Mit den erhaltenen Werten wurde für jede Versuchsreihe schließlich ein Diagramm mit Excel erstellt.

Mit der SPSS® Version 20 (IBM SPSS, IBM Corporation, Armonk, New York, USA) wurde eine multivariate Varianzanalyse (multivariate analysis of variance, MANOVA) zum Vergleich der einzelnen Mittelwerte bei einer bestimmten Frequenz bzw. Konzentration einer Versuchsreihe durchgeführt. Zum Vergleich der gesamten Frequenz- bzw. Konzentrations-Wirkungs-Kurven einer Versuchsreihe wurde eine Zweifach-Varianzanalyse (two-way-ANOVA) mit der gleichen Software durchgeführt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Organbadversuche

Insgesamt wurden im Rahmen der Organbadversuche Kraftmessungen an Gewebeproben von 30 Patienten durchgeführt. Dabei wurden je Patient vier Gewebeproben untersucht, von denen jeweils zwei der Versuchs- und zwei der Kontrollgruppe zugeführt wurden. Die Zuteilung in Versuchs- und Kontrollgruppe (DMSO) erfolgte randomisiert. In fünf verschiedenen Versuchsreihen wurde untersucht, welche Effekte die GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 und MK 0677 auf eine durch verschiedene Reize induzierte Kontraktion des Gewebes haben. Die Gewebekontraktionen wurden in den unterschiedlichen Versuchsreihen entweder durch elektrische Feldstimulation, Noradrenalin, Phenylephrin, ET-1 oder U46619 ausgelöst.

4.1.1 Effekte von L-692,585 auf durch EFS induzierte Kontraktion

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob es durch den GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 zu einer gegenüber der Kontrollgruppe verstärkten, durch EFS induzierten, Kontraktion des Gewebes kommt. Dabei wurden Gewebeproben von 6 Patienten untersucht.

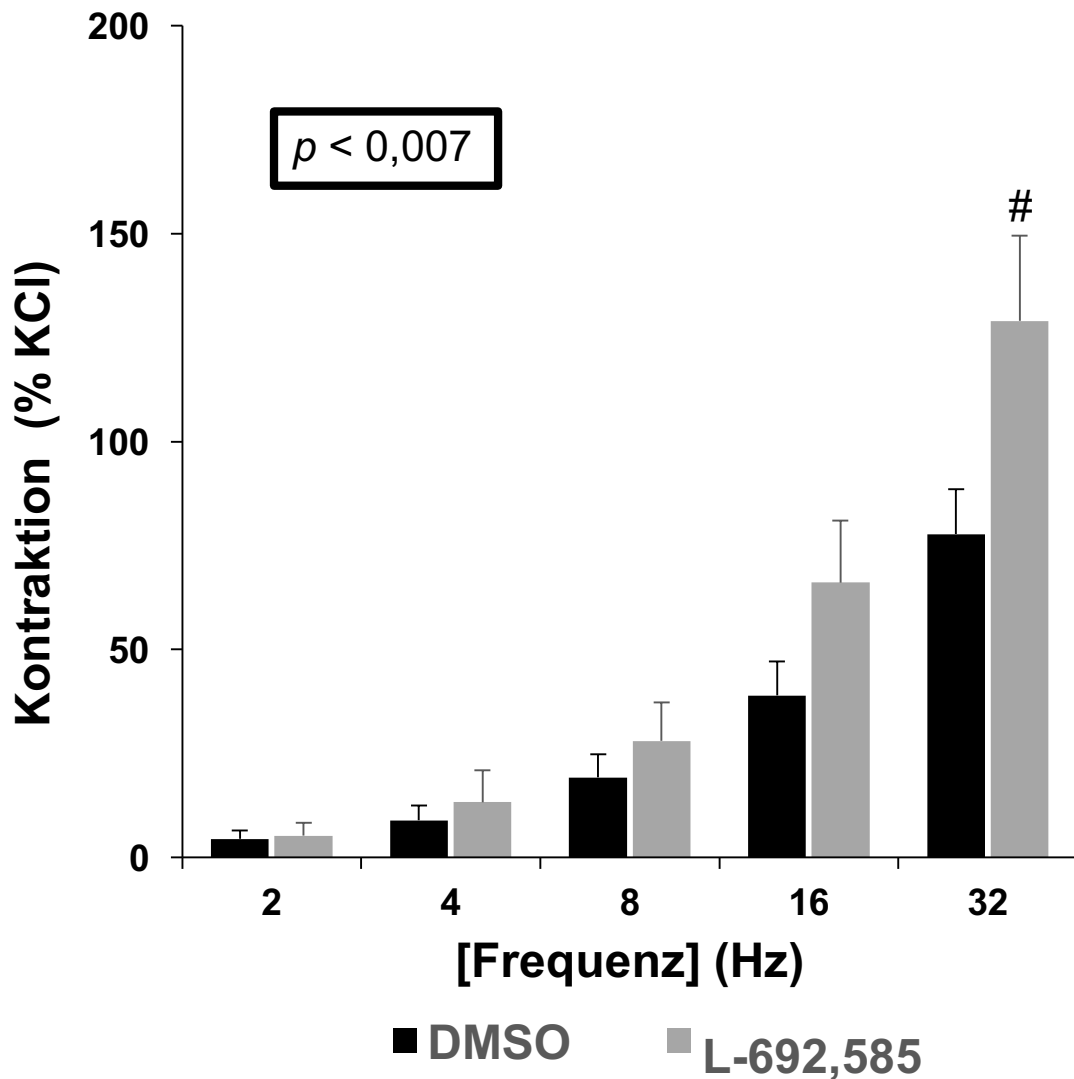


Abbildung 4: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch EFS ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Experimenten mit Prostatagewebe von $n = 6$ Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden. # $p < 0,05$ für jeweilige Frequenz nach multivariater Analyse bzw. p im Insert für ganze Gruppen nach two-way ANOVA.

In Abbildung 4 sind durch elektrische Feldstimulation (EFS) ausgelöste Kontraktionen von humanen Prostatagewebe in An- und Abwesenheit von L-692,585 als Frequenz-Wirkungs-Diagramm dargestellt. Bei jedem der 6 Versuche wurden die in Abbildung 4 gezeigten Frequenzen jeweils nacheinander in allen 4 Organbadkammern angelegt. Die bei der jeweiligen Frequenz ausgelöste maximale Kontraktion des Gewebes wird hier prozentual zur maximalen, durch 400 μ l Kaliumchlorid ausgelösten, Kontraktion gezeigt. Aus den Ergebnissen der Einzelversuche wurden sowohl in der Versuchs- als

auch in der Kontrollgruppe Mittelwerte gebildet und in Abbildung 4 in Form eines Frequenz-Wirkungs-Diagramms veranschaulicht. Der jeweilige Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ist als Fehlerbalken dargestellt.

Nach Inkubation mit dem GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 kam es gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Verstärkung der durch elektrische Feldstimulation (EFS) ausgelösten Kontraktion. Bei 32 Hz fiel diese Verstärkung signifikant aus (multivariate Analyse). Bei anderen Frequenzen, insbesondere bei 16 Hz, traten ebenfalls Verstärkungen auf, ohne dass diese Signifikanzniveau erreichten. Ein Vergleich der gesamten Gruppen (two-way ANOVA) ergab wiederum einen signifikanten Unterschied.

4.1.2 Effekte von L-692,585 auf Kontraktion durch Noradrenalin

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob es durch den GHS-R-Agonisten L-692,585 zu einer gegenüber der Kontrollgruppe verstärkten, durch Noradrenalin induzierten, Kontraktion des Gewebes kommt. Dabei wurden Gewebeproben von 6 Patienten untersucht.

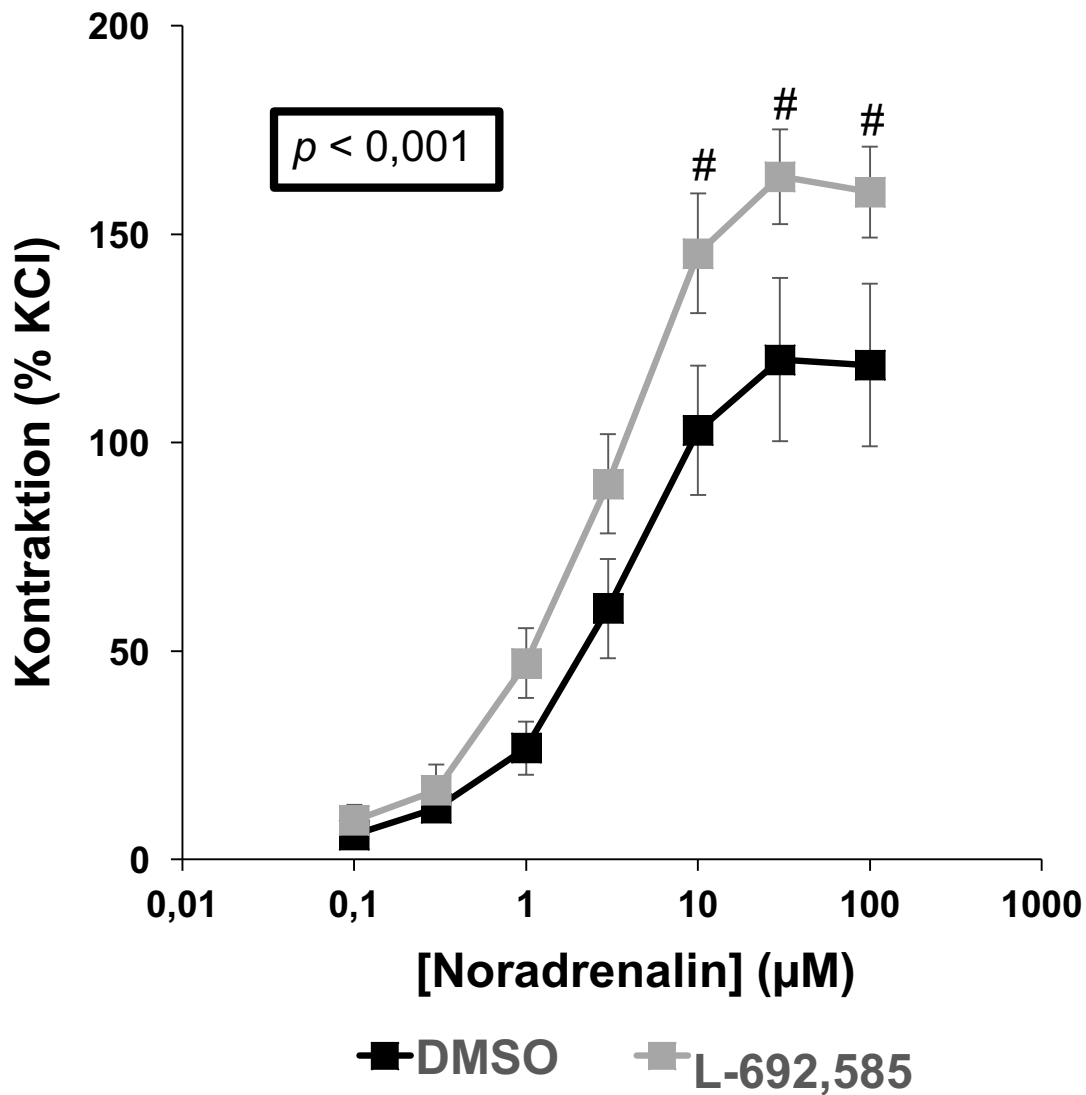


Abbildung 5: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch Noradrenalin ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Experimenten mit Prostatagewebe von $n = 7$ Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden. # $p < 0,05$ für jeweilige Konzentration nach multivariater Analyse bzw. p im Insert für ganze Gruppen nach two-way ANOVA.

In Abbildung 5 sind durch Applikation von Noradrenalin ausgelöste Kontraktionen von humanen Prostatagewebe in An- und Abwesenheit von L-692,585 dargestellt. Bei jedem der 7 Versuche wurde die Konzentration von Noradrenalin, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, schrittweise in allen vier Organbadkammern gleichzeitig gemäß Pipettierschema erhöht. Die bei der jeweiligen Konzentration ausgelöste maximale Kontraktion des Gewebes wird hier prozentual zur maximalen, durch 400 µl Kaliumchlorid ausgelösten, Kontraktion gezeigt. Aus den Ergebnissen der Einzelversuche wurden sowohl in

der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe Mittelwerte gebildet und in Abbildung 5 in Form eines Konzentrations-Wirkungs-Diagramms veranschaulicht. Die jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sind als Fehlerbalken dargestellt.

Nach Inkubation mit dem GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 kam es durch Applikation von Noradrenalin in die Organbadkammern gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Verstärkung der Gewebekontraktion. Bei Noradrenalkonzentrationen von 10 μM , 30 μM und 100 μM fiel diese Verstärkung signifikant aus (multivariate Analyse). Auch bei niedrigeren Konzentrationen traten bereits Verstärkungen auf, ohne dass diese Signifikanzniveau erreichten. Ein Vergleich der gesamten Gruppen (two-way ANOVA) ergab wiederum einen signifikanten Unterschied.

4.1.3 Effekte von MK 0677 auf Kontraktion durch Phenylephrin

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob es durch den GHS-Rezeptor-Agonisten MK 0677 zu einer gegenüber der Kontrollgruppe verstärkten, durch Phenylephrin induzierten, Kontraktion des Gewebes kommt. Dabei wurden Gewebeproben von 6 Patienten untersucht.

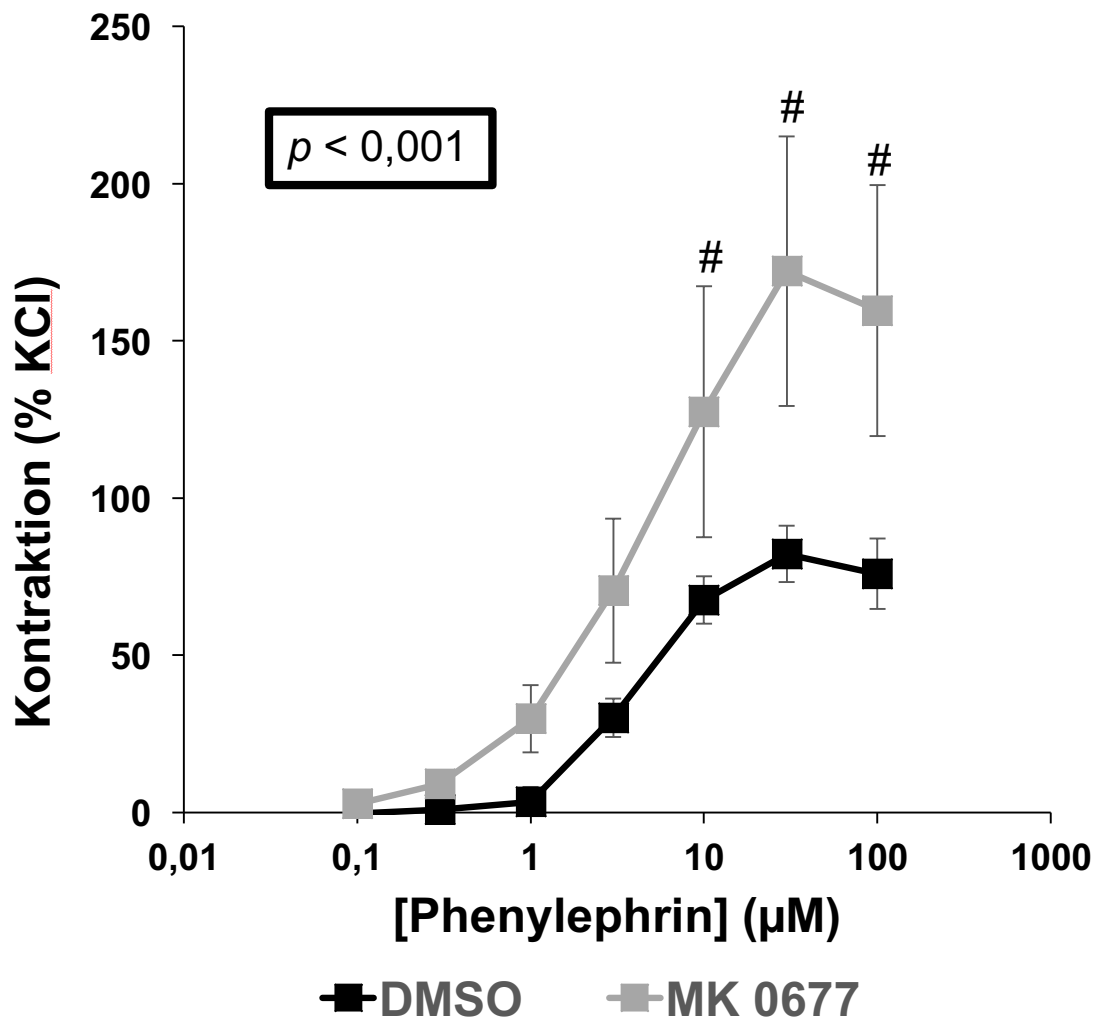


Abbildung 6: Auswirkungen von MK 0677 auf die durch Phenylephrin ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Experimenten mit Prostatageweben von $n = 6$ Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der MK 0677-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden. # $p < 0,05$ für jeweilige Konzentration nach multivariater Analyse bzw. p im Insert für ganze Gruppen nach two-way ANOVA.

In Abbildung 6 sind die im Organbad durch Phenylephrin ausgelösten Kontraktionen von humanen Prostatageweben in An- und Abwesenheit von MK 0677 dargestellt. Bei jedem der 6 Versuche wurde die Konzentration von Phenylephrin, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, schrittweise in allen vier Organbadkammern gleichzeitig gemäß Pipettierschema erhöht. Die durch eine bestimmte Konzentration an Phenylephrin ausgelöste maximale Kontraktion des Gewebes wird hier prozentual zur maximalen, durch 400 μ l Kaliumchlorid ausgelösten, Kontraktion abgebildet. Aus den Ergebnissen der Einzelversuche wurden sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe Mittelwerte

gebildet und in Abbildung 6 in Form eines Konzentrations-Wirkungs-Diagramms veranschaulicht. Die jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sind als Fehlerbalken dargestellt.

Nach Inkubation mit dem GHS-Rezeptor-Agonisten MK 0677 kam es durch Applikation von Phenylephrin in die Organbadkammern gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Verstärkung der Gewebekontraktion. Bei Phenylephrinkonzentrationen von 10 μM , 30 μM und 100 μM fiel diese Verstärkung signifikant aus (multivariate Analyse). Auch bei niedrigeren Konzentrationen traten bereits Verstärkungen auf, ohne dass diese Signifikanzniveau erreichten. Ein Vergleich der gesamten Gruppen (two-way ANOVA) ergab wiederum einen signifikanten Unterschied.

4.1.4 Effekte von L-692,585 auf Kontraktion durch U46619

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob es durch den GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 zu einer gegenüber der Kontrollgruppe verstärkten, durch U46619 induzierten, Kontraktion des Gewebes kommt. Dabei wurden Gewebeproben von 6 Patienten untersucht.

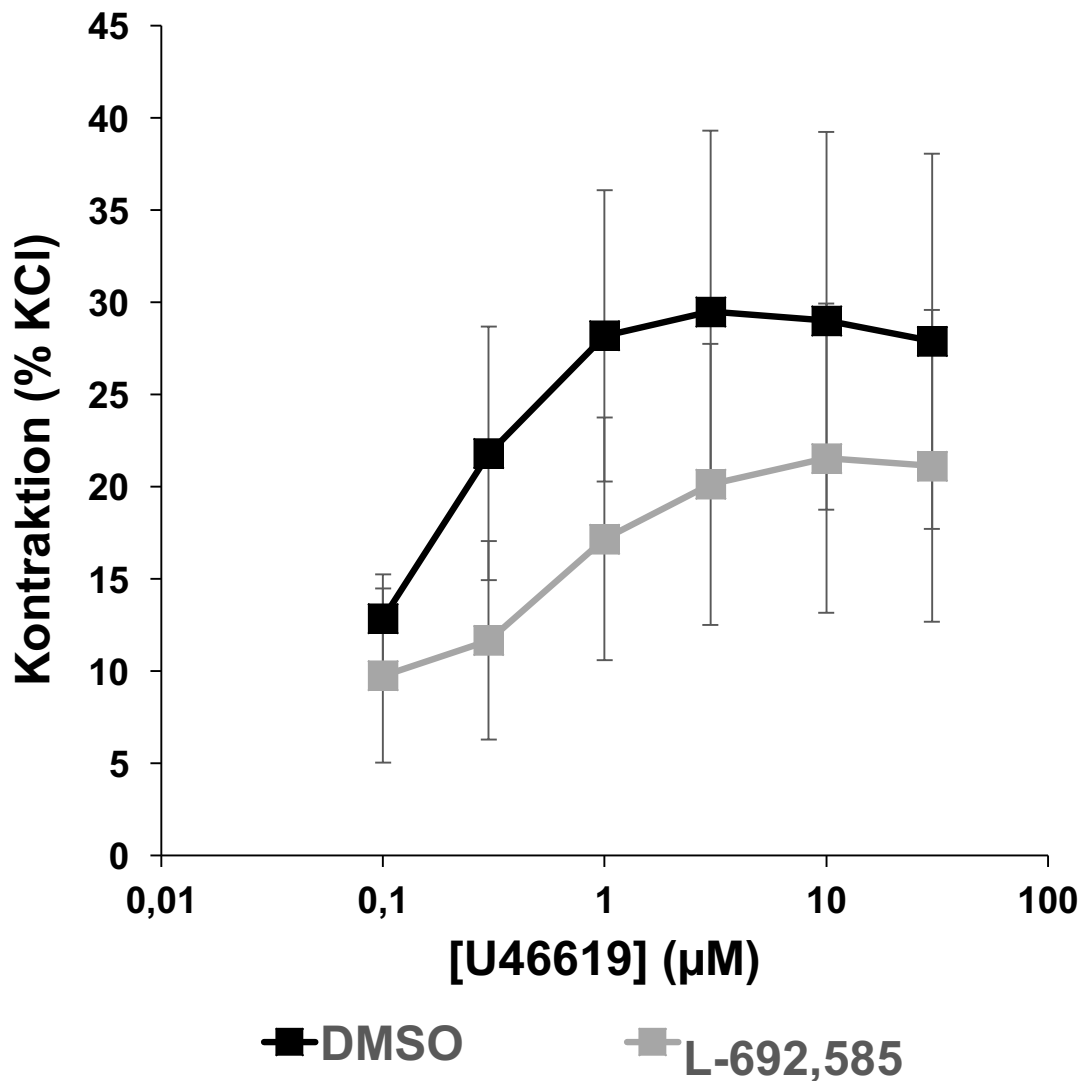


Abbildung 7: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch U46619 ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Experimenten mit Prostatagewebe von $n = 5$ Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden.

In Abbildung 7 sind durch Applikation von U46619 ausgelöste Kontraktionen von humanen Prostatagewebe in An- und Abwesenheit von L-692,585 dargestellt. Bei jedem der 5 Versuche wurde die Konzentration von U46619, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, schrittweise in allen vier Organbadkammern gleichzeitig gemäß Pipettierschema erhöht. Die bei der jeweiligen Konzentration ausgelöste maximale Kontraktion des Gewebes wird hier prozentual zur maximalen, durch 400 µl Kaliumchlorid ausgelösten, Kontraktion gezeigt. Aus den Ergebnissen der Einzelversuche wurden sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe Mittelwerte gebildet und in Abbildung 7 in Form eines

Konzentrations-Wirkungs-Diagramms veranschaulicht. Die jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sind als Fehlerbalken dargestellt.

Nach Inkubation mit dem GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 kam es durch Applikation von U46619 in die Organbadkammern gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Verringerung der Gewebekontraktion. Deutlich zu sehen ist die Überlappung der jeweiligen Fehlerbalken. Der Einfluss von U46619 auf die Kontraktion der Gewebeproben war nicht signifikant.

4.1.5 Effekte von L-692,585 auf Kontraktion durch Endothelin-1

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob es durch den GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 zu einer gegenüber der Kontrollgruppe verstärkten, durch Endothelin-1 induzierten, Kontraktion des Gewebes kommt. Dabei wurden Gewebeproben von 6 Patienten untersucht.

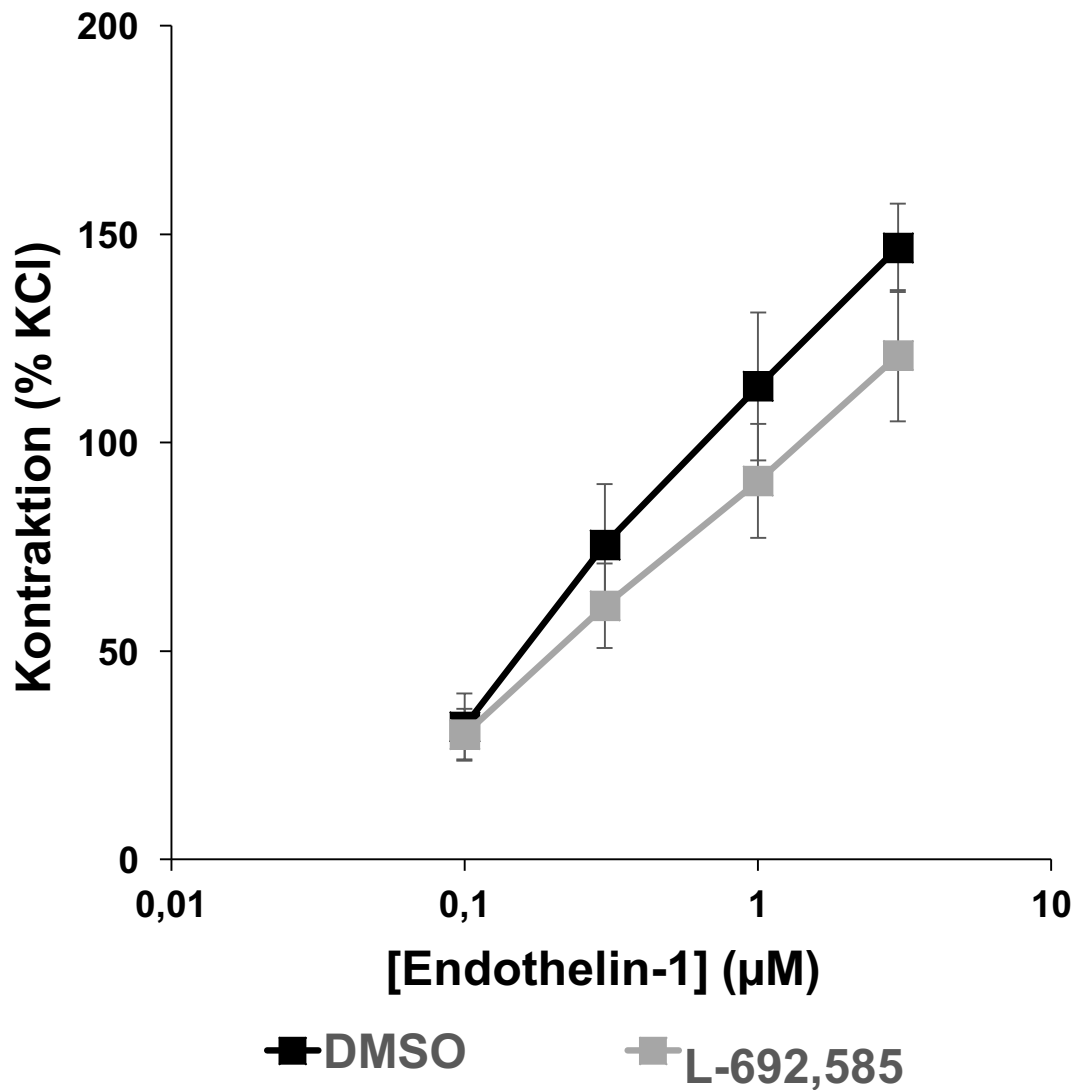


Abbildung 8: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch Endothelin-1 ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von Experimenten mit Prostatagewebe von $n = 6$ Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden.

In Abbildung 8 sind durch Applikation von Endothelin-1 ausgelöste Kontraktionen von humanen Prostatageweben in An- und Abwesenheit von L-692,585 dargestellt. Bei jedem der 6 Versuche wurde die Konzentration von Endothelin-1, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, schrittweise in allen vier Organbadkammern gleichzeitig gemäß Pipettierschema erhöht. Die bei der jeweiligen Konzentration ausgelöste maximale Kontraktion des Gewebes wird hier prozentual zur maximalen, durch 400 µl Kaliumchlorid ausgelösten, Kontraktion gezeigt. Aus den Ergebnissen der Einzelversuche wurden sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe Mittelwerte gebildet und in Abbildung 8 in Form eines Konzentrations-Wirkungs-Diagramms

veranschaulicht. Die jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (SEM) sind als Fehlerbalken dargestellt.

Nach Inkubation mit dem GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 kam es durch Applikation von Endothelin-1 in die Organbadkammern gegenüber der Kontrollgruppe zu einer Verringerung der Gewebekontraktion. Deutlich zu sehen ist die Überlappung der jeweiligen Fehlerbalken. Der Einfluss von Endothelin-1 auf die Kontraktion der Gewebeproben war nicht signifikant.

4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die in Abbildung 9 zu sehende Aufnahme eines fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitts der Prostata wurde mit dem konfokalen Laser Mikroskop Leica SP2 aufgenommen. Gezeigt ist dabei ein repräsentativer Bereich aus einer Serie von $n = 5$ Patienten. Die Immunfluoreszenzfärbung sollte eine mögliche Kolokalisation des GHS-Rezeptors (GHSR) mit glatten Muskelzellen darstellen.

In der Abbildung ist oben links die Emission von blauem Licht als Folge der Bindung von DAPI an die DNA sichtbar. Relativ gleichmäßig sind die kernhaltigen Zellen hier über den Bildausschnitt verteilt.

Oben rechts ist die Emission von rotem Licht zu sehen. Zurückzuführen ist diese Emission in diesen Bereichen auf Cyanin-5. Die im Versuch verwendeten Cy-5-konjugierten Sekundärantikörper richten sich gegen Antigene des Kaninchens und binden somit an die gegen den GHS-Rezeptor (GHSR) gerichteten Primärantikörper. Die in der Abbildung roten Bereiche lassen damit auf ein Vorkommen des Ghrelin-Rezeptors in diesen Bereichen schließen.

Unten links ist eine auf Cyanin-3 zurückzuführende Emission grünen Lichts zu sehen. Die Cy-3-konjugierten Sekundärantikörper richten sich gegen Antigene der Maus und binden somit an die Anti-Calponin 1/2/3 Maus-Antikörper. Diese richten sich gegen in der glatten Muskulatur vorkommendes Calponin. In den grünen Bereichen der Abbildung ist demnach das Vorkommen glatter Muskelzellen anzunehmen.

Unten rechts ist in Abbildung 9 eine Überlagerung bzw. Fusion der Färbungen dargestellt. Auf diese Weise kann das gleichzeitige Vorkommen des GHS-Rezeptors und glatter Muskelzellen besser visualisiert werden. Die deutlich erkennbaren gelblichen Bereiche lassen auf ein Vorkommen des GHS-Rezeptors in der glatten Muskulatur der Prostata schließen (=Kolokalisation).

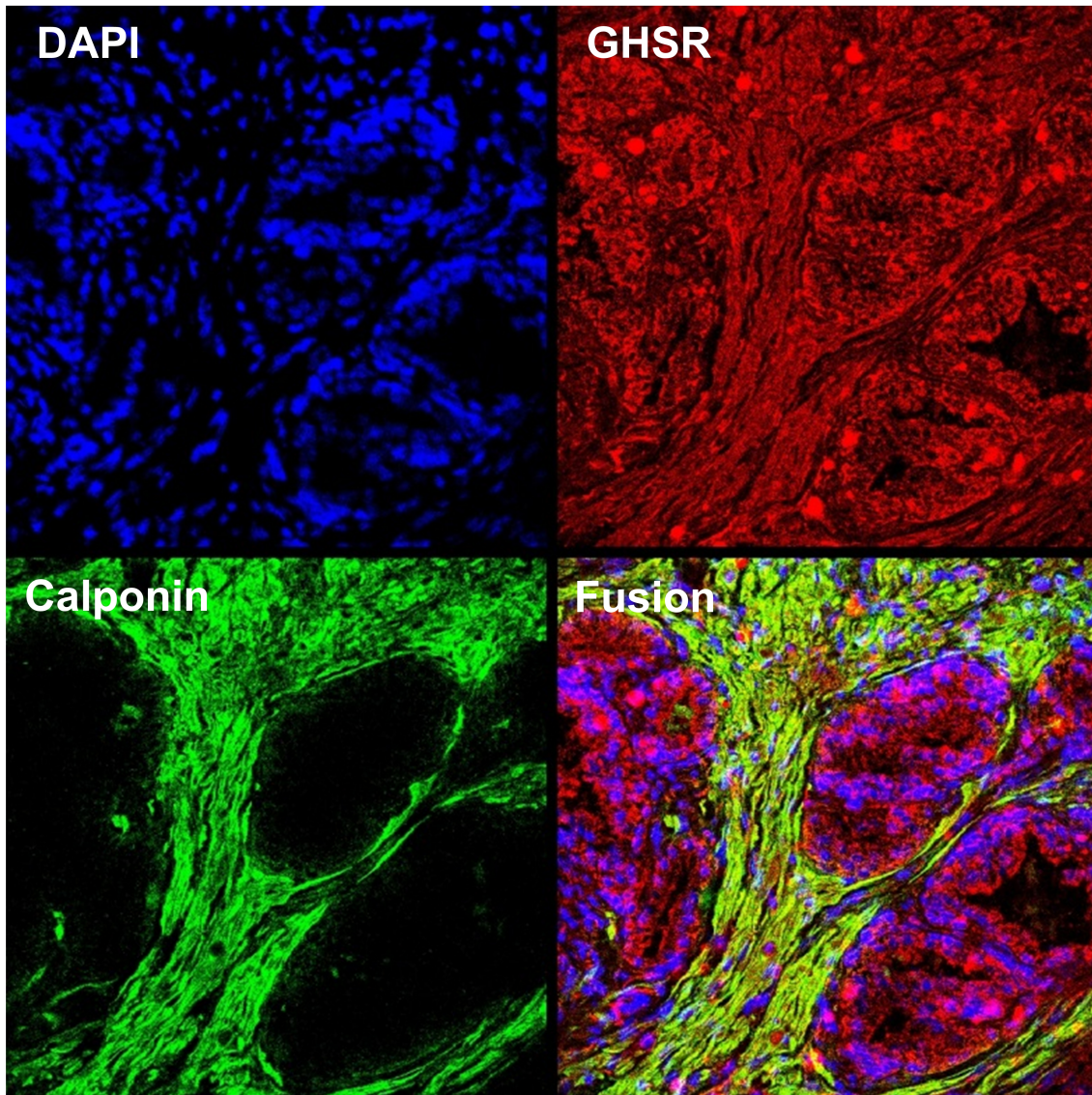


Abbildung 9: Repräsentative Färbung einer Serie mit 5 Gewebeproben. Färbungen von links oben nach rechts unten mit DAPI, sowie Antikörpern gegen den GHSR und Calponin, bzw. überlagertes Bild aller drei Farbkanäle (Fusion).

4.3 Western-Blot-Analysen

In Rahmen der Western-Blot-Analysen wurden Gewebeproben von 8 verschiedenen Patienten untersucht. Es wurde jeweils mit Antikörpern gegen GHS-Rezeptoren, Calponin (einem Marker glatter Muskelzellen), pan-Zytokeratin (einem Marker der Prostataepithelzellen), sowie PSA detektiert. Das *housekeeping* Protein beta-Aktin diente als Ladekontrolle zur Bestätigung korrekter Versuchsbedingungen.

Die untersuchten Gewebeproben ergaben für alle Zielstrukturen individuell unterschiedliche Bandenstärken für die einzelnen Patienten. Bei allen 8 Proben, welche mit dem GHS-Rezeptor-Antikörper inkubiert wurden, waren Banden mit einer Größe von 41 kDa zu sehen (siehe Abbildung 10). Die Banden der mit Anti-Calponin-, Anti-pan-Zytokeratin- sowie Anti-PSA-Antikörper inkubierten Proben waren mit 34, 37-54 bzw. 29 kDa, bei unterschiedlicher Intensität, im Bereich der erwarteten Molekulargewichte der jeweiligen Zielstrukturen (siehe Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 13). Keine Intensitätsunterschiede waren bei den Beta-Aktin-Banden zu sehen (siehe Abbildung 14).

Prostatagewebe von verschiedenen Patienten je Spalte (Patienten 1-8):

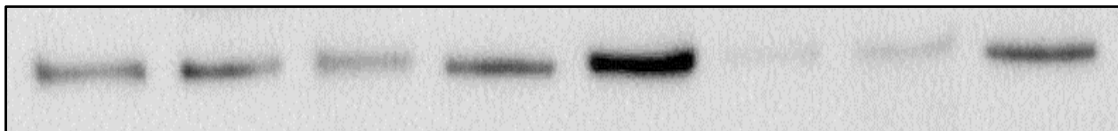


Abbildung 10: GHSR 41kDa.

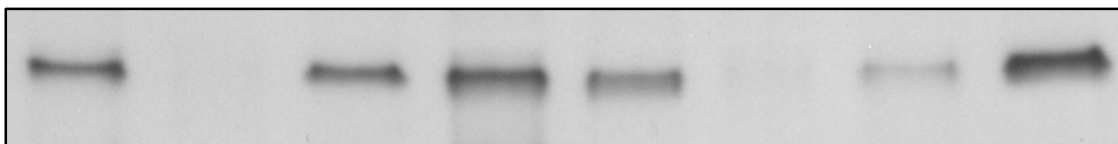


Abbildung 11: Calponin 34 kDa.

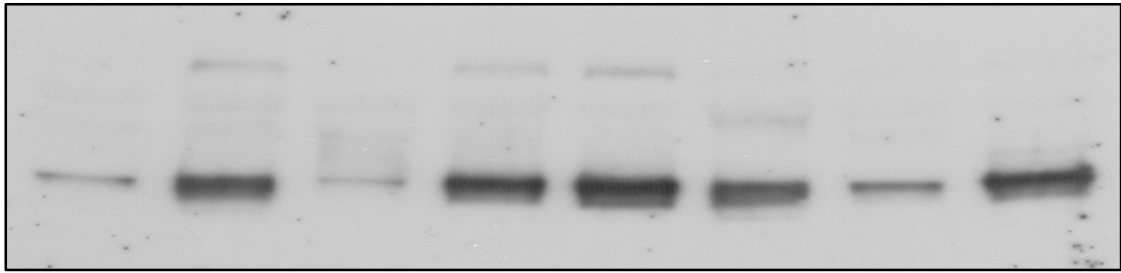


Abbildung 12: pan-Zytokeratin 37-55 kDa.

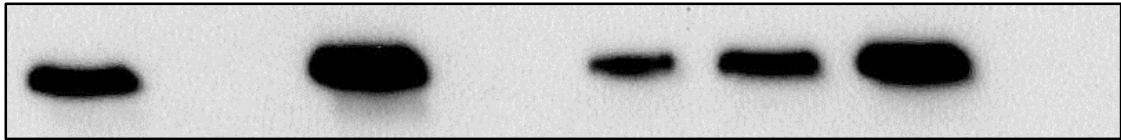


Abbildung 13: PSA 29 kDa.

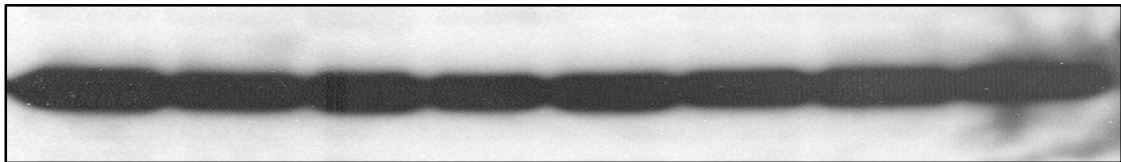


Abbildung 14: Beta-Aktin 42 kDa.

5. Diskussion

Männer im fortgeschrittenen Alter sind sehr häufig von Miktionsstörungen bzw. LUTS betroffen [2]. Die Patienten klagen oft über einen verzögerten Miktionsbeginn, einen abgeschwächten Harnstrahl sowie über Nachträufeln im Anschluss an das Wasserlassen [1, 2]. Zurückzuführen sind diese Symptome meist auf eine Vergrößerung der Prostata infolge einer Prostatahyperplasie durch Wachstum des Prostatastromas und der Prostataepithelzellen [1, 48, 50]. Neben der Hyperplasie spielt zusätzlich ein erhöhter Tonus glatter Muskelzellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Symptomatik [48, 50]. Diese beiden Komponenten führen in Kombination zu einer Kompression der Harnröhre und damit zu einer Blasenauslassobstruktion [1, 3, 48, 50]. Zur medikamentösen Therapie von LUTS infolge BPH werden bislang vor allem zwei Arzneimittelgruppen verwendet [1, 82]. Das Volumen des Prostatagewebes soll mit Hilfe von 5 α -Reduktase-Inhibitoren verringert werden, während der durch den Sympathikus vermittelte Muskeltonus in Prostata und Blasen Hals durch α_1 -Adrenozeptor-Agonisten reduziert werden soll [50, 51, 82].

In der Praxis zeigt sich jedoch, dass die Behandlung mit diesen Mono- und Kombinationstherapien, auch aufgrund von Nebenwirkungen und begrenzter Wirksamkeit, häufig nicht den gewünschten Erfolg bringt [1, 50, 75]. Viele Patienten brechen folglich die Therapie ab [73]. Trotz dieser Einschränkungen sind die Kosten für die Medikamente hoch [1]. Aufgrund der alternden Bevölkerung und der damit verbunden steigenden Zahl an Betroffenen, stellen die Kosten zunehmend eine Belastung für unsere Gesundheitssysteme dar [1, 2].

Neue Therapieoptionen zur Behandlung der LUTS infolge BPH könnte das in zahlreichen Geweben vorkommende metabolische Hormon Ghrelin, welches erst 1999 von Kojima et al. entdeckt wurde, eröffnen [105, 109, 110]. So steht Ghrelin im Verdacht, eine Rolle beim metabolischen Syndrom zu spielen [5]. Darüber hinaus konnte in Tierversuchen eine kontraktile Wirkung von Ghrelin auf glatte Muskulatur nachgewiesen werden [6, 7]. Während bekannt ist, dass ein erhöhter glattmuskulärer Tonus eine Rolle bei der Entstehung der LUTS spielt, zeigen neuere Studien, dass Patienten mit metabolischem Syndrom und

hohem BMI ein erhöhtes Risiko haben, BPH bedingte LUTS zu entwickeln [2, 50].

Vor diesem Hintergrund erschien ein Zusammenhang zwischen Ghrelin und der Entstehung von LUTS infolge BPH möglich und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Hierzu wurden durch verschiedene adrenerge, nicht adrenerge und neurogene Reize Kontraktionen humanen Prostatagewebes ausgelöst und die Auswirkungen der GHS-Rezeptor-Agonisten MK 0677 und L-692,585 auf diese Kontraktionen untersucht.

5.1 Organbadversuche und In-vitro-Studien

Die Grundlagenforschung spielt eine Schlüsselrolle in der Arzneimittelforschung [123]. Dabei sollen neue Zielstrukturen für hochselektive Moleküle gefunden und unbekannte physiologische Prozesse entdeckt werden [123]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu in Organbädern Kontraktionsversuche mit humanem Prostatagewebe in-vitro durchgeführt.

Versuche in Organbädern ermöglichen die Untersuchung von Muskelkontraktionen ex-vivo an intakten, frischen Gewebeproben, also in einem Verbund verschiedener Zelltypen [123]. Organbadstudien stellen ein Bindeglied zwischen In-vivo-Versuchen und einzelnen Zellkulturuntersuchungen dar [123].

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde in anderen Studien häufig nicht humanes Gewebe untersucht [123, 124]. Tierisches Gewebe kann sich von humanem Gewebe durch eine andere Affinität und Verteilung von Rezeptoren unterscheiden [125]. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen ist daher die Verwendung humanen Gewebes, insbesondere in Hinblick auf die Beurteilung der klinischen Relevanz, vorteilhaft. In dieser Arbeit wurden deshalb alle Versuche an humanem Gewebe durchgeführt.

Die Kontraktionen in Organbadversuchen werden häufig, wie auch in der vorliegenden Studie, durch elektrische Feldstimulation oder durch Applikation adrenerger Substanzen, ausgelöst [123, 126, 127]. Es handelt sich dabei um

etablierte Methoden, welche auch speziell zur Untersuchung von Geweben im unteren Harntrakt weite Verwendung finden [123, 124, 126, 127].

Aus offensichtlichen Gründen war es nicht möglich, die Kontraktionsversuche dieser Arbeit in-vivo an Menschen durchzuführen. Gewebe nicht hyperplastischer Organe junger Probanden mit den in der Arbeit verwendeten hyperplastischen Geweben zu vergleichen war nicht möglich, da es ethisch nicht vertretbar gewesen wäre, Prostatektomien oder Gewebeentnahmen nur zu Forschungszwecken an gesunden Patienten durchzuführen.

5.2 Gewebe

Das in den Versuchen verwendete Gewebe wurde im Zuge radikaler Prostatektomien zur Therapie von Patienten mit Prostatakarzinom entnommen. Gewebe von Patienten, bei welchen zuvor eine TURP durchgeführt worden war, wurde wegen des üblicherweise damit einhergehenden Gewebeschadens nicht verwendet [126].

Um möglichst vitales Gewebe für die Organbadversuche zu erhalten, wurden die Organe sofort nach operativer Entfernung in eine protektive Lösung, wie sie auch zum Transport von Organtransplantaten verwendet wird, eingelegt und das Gewebe unverzüglich den Versuchen zugeführt. Die Versuche wurden in auf 37 °C erwärmten Organbädern durchgeführt, um physiologischen Bedingungen möglichst nahe zu kommen. Gewebe für die Western-Blot-Analysen und die Immunfluoreszenzfärbung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Versuchsdurchführung gelagert.

Um nicht malignes Gewebe zu erhalten, wurde bei der Gewebeentnahme durch die Pathologie nur makroskopisch tumorfreies Gewebe aus der normalerweise nicht von Malignomen betroffenen periurethralen Zone entnommen [11, 19]. Diese Praxis hatte sich bereits in anderen Studien bewährt [126, 127].

Weil die periurethrale Zone häufig Ausgangspunkt der BPH ist, eignete sich das Gewebe aus diesem Bereich sehr gut für die grundlagenwissenschaftlichen Versuche im Rahmen dieser Arbeit [11, 19]. Wie in den Western-Blot-Analysen

des Prostatagewebes zu sehen ist, gab es zwischen den einzelnen Patientenproben individuelle Unterschiede in der Expression von Calponin, einem Marker glatter Muskelzellen und pan-Zytokeratin, einem Marker von Prostataepithelzellen. Der Anteil an muskelhaltigem Stroma im Verhältnis zum Anteil an Drüsengewebe war in den untersuchten Geweben also nicht immer gleich. Auch die Expression von PSA in den Gewebeproben unterschied sich in den Western-Blot-Analysen zum Teil deutlich. Demnach kann auch eine unterschiedlich starke Ausprägung der benignen Prostatahyperplasie in den verwendeten Geweben angenommen werden. Hierbei ist anzumerken, dass das Prostata spezifische Antigen (PSA) nicht nur als Marker des Prostatakarzinoms, sondern auch als Marker einer BPH dient [128].

Um die individuell unterschiedlichen Anteile an Muskel- und Drüsengewebe bzw. die unterschiedliche Ausprägung der BPH ausgleichen zu können, wurde bei den Kontraktionsversuchen im Organbad stets die durch die Agonisten erreichte Kontraktion in Bezug zu einer zuvor durch Kaliumchlorid ausgelösten Kontraktion gesetzt [127]. Diese Vorgehensweise war nötig, um die einzelnen Versuche miteinander vergleichen zu können und ist allgemein akzeptiert [126, 127].

5.3 Vorkommen des GHS-Rezeptors

In den Western-Blot-Analysen wurde jeweils die mögliche GHS-Rezeptor-Expression in Gewebeproben von acht verschiedenen Patienten bestimmt. Es sollte gezeigt werden, ob und wie stark sich die Expression des Ghrelinrezeptors (GHS-Rezeptor) in den verschiedenen Gewebeproben unterscheidet.

In allen Proben, die mit dem GHS-Rezeptor-Antikörper orb323279 inkubiert wurden, konnten, bei geringen interindividuellen Unterschieden, Banden bei einem Molekulargewicht von 41 kDa nachgewiesen werden. Weil auch das Molekulargewicht des GHS-Rezeptors im Bereich von 41 kDa liegt, erscheint ein Vorkommen des GHS-Rezeptors in den untersuchten Organen wahrscheinlich.

In der Immunfluoreszenzfärbung konnte der Nachweis einer Kolo­kalisierung der Immunreaktivitäten des GHS-Rezeptor-Antikörpers orb323279 mit dem Antikörper sc-136987, welcher gegen in glatten Muskelzellen vorkommendes Calponin gerichtet ist, erbracht werden. Daraus kann auf eine Expression des Ghrelinrezeptors (GHS-Rezeptor) in der glatten Muskulatur des untersuchten Gewebes geschlossen werden.

Sowohl das Vorkommen des metabolischen Hormons Ghrelin als auch des GHS-Rezeptors in humanem Gewebe, wurde bereits von Gnanapavan et al. und Ueberberg et al. beschrieben [109, 110]. Sie zeigten in ihren Versuchen, dass Ghrelin nicht nur in der Hypophyse sowie im Magen, sondern auch in vielen anderen Geweben vorkommt [109, 110]. Ueberberg et al. nutzten dabei spezielle RNA-Gewebesonden [109]. Gnanapavan et al. hingegen verwendeten Gewebe, welches im Rahmen von Operationen gewonnen und direkt im Anschluss daran schockgefroren worden war. Gnanapavan et al. konnten mittels PCR das Vorkommen von Ghrelin-mRNA bzw. der mRNA-Expression des GHS-Rezeptor-Subtyps GHSR-1b in humanem Prostatagewebe nachweisen [110]. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich bei den Versuchen von Ueberberg et al. [109].

Insgesamt sprechen diese Erkenntnisse für ein Vorkommen des GHS-Rezeptors in den glatten Muskelzellen des humanen Prostatagewebes. Eine Regulation der glattnuskulären Kontraktion im Prostatagewebe durch den GHS-Rezeptor scheint damit möglich.

5.4 Wirkung von Ghrelin auf glatte Muskelzellen

In den Organbadversuchen wurden fünf Versuchsreihen durchgeführt, um die Effekte der Ghrelin-Agonisten L-692,585 sowie MK 0677 auf die glattnuskuläre Kontraktion von humanem Prostatagewebe zu untersuchen. Insgesamt wurden Gewebeproben von 30 verschiedenen Patienten verwendet.

5.4.1 Neurogene und adrenerge Kontraktion

Die Kontraktion glatter Muskelzellen in der Prostata wird durch die sympathische Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren vermittelt [50]. Durch elektrische Feldstimulation können Aktionspotentiale im Organbad simuliert werden [127]. Dabei werden endogene Neurotransmitter wie z. B. Noradrenalin im Gewebe freigesetzt [127]. Noradrenalin bindet dann an die postsynaptischen α_1 -Adrenozeptoren der glatten Muskelzellen und vermittelt so eine neurogene Kontraktion der Muskelzellen [50]. In der 1. Versuchsreihe dieser Arbeit wurde die Kontraktion der Gewebeproben im Organbad auf diese Weise induziert. Dabei konnte bei jenen Proben, welche mit dem Ghrelin-Agonisten L-692,585 inkubiert wurden, eine stärkere Kontraktion festgestellt werden als in der Kontrollgruppe.

Die Stimulation der α_1 -Adrenozeptoren in-vitro kann nicht nur über EFS, sondern auch direkt durch Applikation des natürlichen α_1 -Adrenozeptor-Agonisten Noradrenalin erfolgen [50]. Dieser Ansatz wurde in der 2. Versuchsreihe verfolgt. Dabei fiel die Gewebekontraktion in Organbädern mit L-692,585, genau wie in der 1. Versuchsreihe, stärker aus als in der Kontrollgruppe.

In der 3. Versuchsreihe wurden die Gewebeproben mit einem anderen, strukturell von L-692,585 verschiedenem, GHS-Rezeptor-Agonisten, MK 0677, inkubiert. Die Kontraktion wurde auch in dieser Versuchsreihe durch Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren induziert. Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchsreihen wurde jedoch der synthetische selektive α_1 -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin verwendet. Auch unter diesen veränderten Versuchsbedingungen führte der GHS-Rezeptor-Agonist zu stärkerer durch Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren hervorgerufener Muskelkontraktion als in der Vergleichsgruppe. Daher bestätigen diese drei Versuchsreihen denselben Effekt unter verschiedenen Bedingungen.

5.4.2 Nicht adrenerge Kontraktion

Neuere Studien zeigen, dass die Kontraktion glatter Muskelzellen in der humanen Prostata nicht nur über die Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren vermittelt wird, sondern auch durch TXA₂ bzw. TXA₂-Rezeptor-Agonisten hervorgerufen werden kann [97, 98]. Wegen der kurzen Halbwertszeit von 32 Sekunden eignet sich TXA₂, welches in das stabile, aber biologisch inaktive Thromboxan B₂ zerfällt, nicht besonders gut für In-vitro-Versuche [96, 98]. Es wird daher für solche Zwecke häufig der stabile synthetische TXA₂-Rezeptor-Agonist U46619 verwendet [98]. Dieser vermittelt seine Wirkung genau wie TXA₂ über TXA₂-Rezeptoren [96, 98].

In der 4. Versuchsreihe wurden die Muskelkontraktionen durch Applikation des TXA₂-Rezeptor-Agonisten U46619 induziert und der Effekt des GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 beobachtet. Gegenüber der Kontrollgruppe kam es dabei in Anwesenheit von L-692,585 zu keiner Verstärkung der Gewebekontraktion.

In anderen Studien zeigte sich, dass auch Endothelin-1 über spezielle Endothelinrezeptoren eine mit Phenylephrin vergleichbar starke Kontraktion der glatten Muskulatur in der Prostata auslösen kann [104]. Die Kontraktionen wurden deshalb in der 5. Versuchsreihe durch Zugabe von Endothelin-1 in die Organbadkammern induziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es in Anwesenheit des GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 gegenüber der Kontrollgruppe nach Applikation von Endothelin-1 zu keiner Verstärkung der Gewebekontraktion kommt.

5.4.3 Bedeutung der Effekte von Ghrelin

Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das hauptsächlich im Magen gebildete metabolische Peptidhormon Ghrelin eine vasokonstriktorische Wirkung auf glatte Muskelzellen hat [105, 106, 129]. So konnten Pemberton et al. in Organbadversuchen eine Verstärkung der Konstriktion von Koronararterien durch Ghrelin zeigen [6]. Grossini et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass durch direkte Applikation von Ghrelin in die

Koronararterien auch in-vivo an Schweinen eine Vasokonstriktion der Koronararterien ausgelöst werden kann [7].

Insgesamt kam es in den Versuchsreihen 1-3 durch neurogen und adrenerg induzierte Kontraktionen zu einer Verstärkung der Gewebekontraktion durch den jeweiligen GHS-Rezeptor-Agonisten gegenüber der Kontrollgruppe. In den Versuchsreihen 4 und 5 zeigte sich bei nicht adrenerg induzierter Kontraktion hingegen kein signifikanter Effekt von L-692,585 auf die Gewebekontraktion.

Es ist deshalb davon auszugehen, dass Ghrelin bzw. die GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 und MK 0677 einen modulierenden Einfluss auf die neurogen und adrenerg induzierte, über α_1 -Adrenozeptoren vermittelte glattnuskuläre Kontraktion haben. Unklar ist jedoch, wie genau diese Modulation auf zellulärer Ebene abläuft. Denkbar wäre eine Stimulation des GHS-Rezeptor-Subtyps GHSR-1a, dessen Vorkommen in der Prostata bislang jedoch nicht gezeigt werden konnte. Wird der GHSR-1a stimuliert, können je nach Zelltyp verschiedene Signalwege über G-Proteine mit $G\alpha_q$ -, $G\alpha_{12/13}$ -, $G\alpha_s$ - oder $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit aktiviert werden [106, 107]. Von entscheidender Bedeutung scheinen Signalwege über die Kopplung von G-Proteinen mit $G\alpha_q$ -Untereinheit zu sein [106]. Nach Aktivierung der Phospholipase-C kommt es über Inositolphosphat zur Ca^{2+} -Ausschüttung [106]. Diese sogenannte IP_3 -Kaskade spielt auch bei der Kontraktion glatter Muskelzellen eine entscheidende Rolle [50].

Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus wäre die Vermittlung des Effekts von Ghrelin über sogenannte GRLR (Ghrelin Receptor-Like Receptors) [106]. Hierfür spräche die Beobachtung, dass Ghrelin trotz fehlenden Nachweises eines spezifischen Rezeptors in vielen Geweben Wirkung zeigt [106]. Dazu gehören beispielsweise die Vermittlung der Lipidakkumulation in Adipozyten, die Förderung der Differenzierung von Myoblasten und Proliferation von Osteoblasten sowie auch die Rolle Ghrelins bei der Konstriktion von Koronararterien [106].

Kontraktionsversuche an humanem Prostatagewebe, in welchen die Wirkungen von Ghrelin oder GHS-Rezeptor-Agonisten untersucht wurden, sind bisher nicht bekannt.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit erscheinen vor dem Hintergrund anderer Studien plausibel und liefern erstmals Hinweise auf eine möglicherweise durch Ghrelin-Hormone bzw. GHS-Rezeptor-Agonisten verstärkte, neurogen und adrenerg vermittelte, Kontraktion der glatten Muskulatur in der humanen, hyperplastischen Prostata.

5.5 Klinische Einordnung und Schlussfolgerungen

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Ghrelin bei Patienten mit benigner Prostatahyperplasie den Tonus der glatten Muskelzellen in der Prostata erhöhen könnte und damit die Blasenauslassobstruktion (BOO) bzw. Benigne Prostataobstruktion (BPO) der Betroffenen durch mechanische Einengung der Harnröhre verstärken könnte. Gemäß dem in Kapitel 1.3.4 beschriebenen Konzept kann man bei der Entstehung von LUTS infolge einer BPH eine statische von einer dynamischen Komponente der pathophysiologisch ursächlichen BOO bzw. BPO unterscheiden [3, 48]. Die statische Komponente umfasst die Folgen einer Prostatavergrößerung durch Wachstum des Prostatastromas sowie der Epithelzellen [48]. Die dynamische Komponente entsteht durch einen erhöhten α_1 -adrenergen Tonus der glatten Muskulatur [48]. Neben den in dieser Arbeit gezeigten möglichen Auswirkungen auf die dynamische Komponente, könnte Ghrelin im Verdacht stehen, auch Auswirkungen auf die statische Komponente der BOO bzw. BPO zu haben [2, 5].

Sollten sich diese Vermutungen bestätigen, könnte die medikamentöse Behandlung der beiden Komponenten der BOO bzw. BPO und der daraus resultierenden LUTS künftig möglicherweise mittels einer einzigen Arzneimittelgruppe durchgeführt werden.

Es wurden bereits viele verschiedene Liganden am GHS-Rezeptor auf ihr therapeutisches Potential hin untersucht [106]. Weil der GHS-Rezeptor eine relativ hohe Ruheaktivität besitzt, erscheint die Verwendung inverser Agonisten am vielversprechendsten [130]. Durch einen inversen Agonisten wird nicht nur die Aktivierung des Rezeptors durch Ghrelin kompetitiv gehemmt, sondern auch die kontinuierliche Aktivität des Rezeptors inhibiert [107, 130]. Denney et al.

konnten in ihren Versuchen bei oraler Gabe eines inversen Agonisten eine gute Verträglichkeit an jungen, gesunden männlichen Erwachsenen nachweisen [130].

Bislang sind für die gleichzeitige medikamentöse Behandlung von statischer und dynamischer Komponente der LUTS mit den 5 α -Reduktase-Inhibitoren und den α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten zwei verschiedene Arzneimittelgruppen notwendig [50, 51]. Zusammen dominieren diese beiden Arzneimittelgruppen mit 88 % Marktanteil den Weltmarkt, sind aber nur bei milder bis moderater Symptomatik indiziert [1]. Infolge der steigenden Anzahl an Patienten mit schwerer Symptomatik, sind entsprechend immer mehr Patienten auf eine operative Therapie angewiesen [1].

Unter Berücksichtigung des demographischen Wandels und der altersabhängigen Prävalenz der LUTS wäre es wünschenswert, neue Therapieoptionen zu finden, welche gegenüber den aktuell verfügbaren Medikamenten geringere Abbruchraten und eine höhere Effektivität aufweisen [1-3, 50, 73].

Letztlich ist es notwendig, die Rolle der metabolischen Ghrelin-Hormone bei der Entstehung von LUTS infolge BPH durch weitere Studien genauer zu untersuchen, da so möglicherweise ein vielversprechender Ansatz bei der Behandlung der LUTS infolge BPH gefunden werden kann.

6. Zusammenfassung

Obstruktive Miktionsstörungen aufgrund einer Verengung der Harnröhre sind bei Männern im höheren Alter eine sehr häufig vorkommende Pathologie [3, 48, 49]. Die mit bisher verfügbaren medikamentösen Therapieoptionen erreichbaren Ergebnisse sind jedoch nicht zufriedenstellend [50, 75].

Das metabolische Hormon Ghrelin spielt in vielen Geweben des Körpers eine noch unzureichend erforschte Rolle [109, 110]. Erste Hinweise auf Auswirkungen auf das metabolische Syndrom und auf die Kontraktion glatter Muskulatur lassen eine mögliche Beteiligung Ghrelins bei der Entstehung von Miktionsbeschwerden bzw. LUTS vermuten [5-7].

Ziel war es deshalb herauszufinden, ob es durch Ghrelin möglicherweise zu einer Verstärkung der glattemuskulären Kontraktion von humanem Prostatagewebe kommt.

In Organbädern wurden hierzu Kontraktionsversuche an humanem Prostatagewebe durchgeführt, welches zuvor bei radikalen Prostatektomien entnommen worden war. Es wurden durch verschiedene adrenerge, nicht adrenerge und neurogene Reize Kontraktionen ausgelöst und die Auswirkungen der GHS-Rezeptor-Agonisten L-692,585 und MK 0677 auf die Kontraktionskraft überprüft. Mittels Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbung wurde versucht, das Vorkommen des GHS-Rezeptors im humanen Prostatagewebe nachzuweisen.

Die durch adrenerge und neurogene Reize ausgelösten Kontraktionen waren in der Versuchsgruppe signifikant stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Für die durch nicht-adrenerge Reize (U46619, ET-1) induzierten Kontraktionen zeigten sich keine Unterschiede im Kontraktionsverhalten zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung und der Western-Blot-Analysen lassen auf ein Vorkommen des GHS-Rezeptors in der glatten Muskulatur der humanen Prostata schließen. Somit scheint eine Regulation des Muskeltonus in der Prostata durch Ghrelin über den GHS-Rezeptor möglich.

Erste In-vivo-Versuche an gesunden Männern mit Medikamenten, welche die Aktivität des GHS-Rezeptors reduzieren können, erwiesen sich als gut verträglich und lassen eine klinische Translation bzw. Anwendbarkeit der hier präsentierten Ergebnisse grundsätzlich möglich erscheinen [130]. Insgesamt könnten die Ergebnisse dieser Arbeit demnach einen interessanten Beitrag für die zukünftige Behandlung von LUTS infolge BPH darstellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Ventura, S., et al., *Novel drug targets for the pharmacotherapy of benign prostatic hyperplasia (BPH)*. Br J Pharmacol, 2011. **163**(5): p. 891-907.
2. Vignozzi, L., M. Gacci, and M. Maggi, *Lower urinary tract symptoms, benign prostatic hyperplasia and metabolic syndrome*. Nat Rev Urol, 2016. **13**(2): p. 108-19.
3. Oelke, M., M.A. Kuczyk, and T.R. Herrmann, *[Pharmacological treatment of benign prostatic hyperplasia]*. Urologe A, 2009. **48**(11): p. 1365-75; quiz 1376-7.
4. Timms, B.G. and L.E. Hofkamp, *Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia*. Differentiation, 2011. **82**(4-5): p. 173-83.
5. Ukkola, O., S.M. Poykko, and Y. Antero Kesaniemi, *Low plasma ghrelin concentration is an indicator of the metabolic syndrome*. Ann Med, 2006. **38**(4): p. 274-9.
6. Pemberton, C.J., et al., *Ghrelin induces vasoconstriction in the rat coronary vasculature without altering cardiac peptide secretion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. H1522-9.
7. Grossini, E., et al., *Intracoronary ghrelin infusion decreases coronary blood flow in anesthetized pigs*. Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 806-12.
8. Kumar, V.L. and P.K. Majumder, *Prostate gland: structure, functions and regulation*. Int Urol Nephrol, 1995. **27**(3): p. 231-43.
9. Berry, S.J., et al., *The development of human benign prostatic hyperplasia with age*. J Urol, 1984. **132**(3): p. 474-9.
10. Walker, J.W., *On the Surgical Anatomy of the Prostate*. J Anat Physiol, 1906. **40**(Pt 3): p. 189-209.
11. McNeal, J.E., *The zonal anatomy of the prostate*. Prostate, 1981. **2**(1): p. 35-49.
12. Myers, R.P., J.C. Cheville, and W. Pawlina, *Making anatomic terminology of the prostate and contiguous structures clinically useful: historical review and suggestions for revision in the 21st century*. Clin Anat, 2010. **23**(1): p. 18-29.
13. Vermooten, V. and M. Schweinsberg, *RADIOGRAPHIC ESTIMATION OF THE SIZE OF THE PROSTATE*. Radiology, 1964. **82**: p. 1010-5.
14. Steiner, M.S., *Continence-preserving anatomic radical retropubic prostatectomy*. Urology, 2000. **55**(3): p. 427-35.
15. Winter, C.C., *Prostatic carcinoma involving the rectum; the problem of differentiation from other malignant lesions*. Calif Med, 1955. **82**(2): p. 85-90.
16. Sajjad, Y., *Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo*. J Obstet Gynaecol Res, 2010. **36**(5): p. 929-37.
17. Roosen, A., et al., *[Etiology and pathophysiology of benign prostate hyperplasia]*. Urologe A, 2013. **52**(2): p. 186-92.
18. McNeal, J.E., *Normal histology of the prostate*. Am J Surg Pathol, 1988. **12**(8): p. 619-33.
19. Oesterling, J.E., *Benign prostatic hyperplasia: a review of its histogenesis and natural history*. Prostate Suppl, 1996. **6**: p. 67-73.
20. Zhang, G., et al., *Radiological Findings of Prostatic Arterial Anatomy for Prostatic Arterial Embolization: Preliminary Study in 55 Chinese Patients with Benign Prostatic Hyperplasia*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132678.
21. de Assis, A.M., et al., *Pelvic Arterial Anatomy Relevant to Prostatic Artery Embolisation and Proposal for Angiographic Classification*. Cardiovasc Intervent Radiol, 2015. **38**(4): p. 855-61.
22. Walsh, P.C. and P.J. Donker, *Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention*. 1982. J Urol, 2002. **167**(2 Pt 2): p. 1005-10.
23. Duncan, M.W. and H.S. Thompson, *Proteomics of semen and its constituents*. Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(8): p. 861-75.
24. Gonzales, G.F., *Function of seminal vesicles and their role on male fertility*. Asian J Androl, 2001. **3**(4): p. 251-8.

25. Mann, T., *Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction*. J Reprod Fertil, 1974. **37**(1): p. 179-88.
26. Kavanagh, J.P., *Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid*. J Reprod Fertil, 1985. **75**(1): p. 35-41.
27. Owen, D.H. and D.F. Katz, *A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant*. J Androl, 2005. **26**(4): p. 459-69.
28. Yoshida, K., et al., *Physiological roles of semenogelin I and zinc in sperm motility and semen coagulation on ejaculation in humans*. Mol Hum Reprod, 2008. **14**(3): p. 151-6.
29. Goldblatt, M.W., *Constituents of human seminal plasma*. Biochem J, 1935. **29**(6): p. 1346-57.
30. Wolters-Everhardt, E., et al., *Buffering substances of human semen*. Fertil Steril, 1987. **48**(1): p. 159-61.
31. Everaert, K., et al., *Neuroanatomy and neurophysiology related to sexual dysfunction in male neurogenic patients with lesions to the spinal cord or peripheral nerves*. Spinal Cord, 2010. **48**(3): p. 182-91.
32. Revenig, L., A. Leung, and W. Hsiao, *Ejaculatory physiology and pathophysiology: assessment and treatment in male infertility*. Transl Androl Urol, 2014. **3**(1): p. 41-9.
33. Puppo, V. and G. Puppo, *Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: Premature ejaculation is not a disease*. Clin Anat, 2016. **29**(1): p. 111-9.
34. Gottardo, F. and S. Kliesch, *[Semen analysis: spermiogram according to WHO 2010 criteria]*. Urologe A, 2011. **50**(1): p. 101-8.
35. Berges, R., *[Epidemiology of benign prostatic syndrome. Associated risks and management data in German men over age 50]*. Urologe A, 2008. **47**(2): p. 141-8.
36. Jonas, U., et al., *[Benign prostate hyperplasia]*. Urologe A, 2006. **45 Suppl 4**: p. 134-44.
37. Chapple, C.R., et al., *Lower urinary tract symptoms revisited: a broader clinical perspective*. Eur Urol, 2008. **54**(3): p. 563-9.
38. Abrams, P., et al., *The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society*. Neurourol Urodyn, 2002. **21**(2): p. 167-78.
39. McVary, K.T., *BPH: epidemiology and comorbidities*. Am J Manag Care, 2006. **12**(5 Suppl): p. S122-8.
40. Gabuev, A. and M. Oelke, *[Latest trends and recommendations on epidemiology, diagnosis, and treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH)]*. Aktuelle Urol, 2011. **42**(3): p. 167-78.
41. Berges, R.R., et al., *Male lower urinary tract symptoms and related health care seeking in Germany*. Eur Urol, 2001. **39**(6): p. 682-7.
42. Berges, R. and M. Oelke, *Age-stratified normal values for prostate volume, PSA, maximum urinary flow rate, IPSS, and other LUTS/BPH indicators in the German male community-dwelling population aged 50 years or older*. World J Urol, 2011. **29**(2): p. 171-8.
43. Nicholson, T.M. and W.A. Riche, *Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future*. Differentiation, 2011. **82**(4-5): p. 184-99.
44. Sanda, M.G., et al., *Clinical and biological characteristics of familial benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 1997. **157**(3): p. 876-9.
45. Sanda, M.G., et al., *Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 1994. **152**(1): p. 115-9.
46. Schauer, I.G., et al., *Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia*. Urology, 2008. **72**(1): p. 205-13.

47. Peters, T.J., et al., *The International Continence Society "Benign Prostatic Hyperplasia" Study: the bothersomeness of urinary symptoms*. J Urol, 1997. **157**(3): p. 885-9.
48. Roehrborn, C.G. and D.A. Schwinn, *Alpha1-adrenergic receptors and their inhibitors in lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2004. **171**(3): p. 1029-35.
49. Chapple, C., *Overview on the lower urinary tract*. Handb Exp Pharmacol, 2011(202): p. 1-14.
50. Hennenberg, M., C.G. Stief, and C. Gratzke, *Prostatic alpha1-adrenoceptors: new concepts of function, regulation, and intracellular signaling*. Neurourol Urodyn, 2014. **33**(7): p. 1074-85.
51. Schwinn, D.A. and C.G. Roehrborn, *Alpha1-adrenoceptor subtypes and lower urinary tract symptoms*. Int J Urol, 2008. **15**(3): p. 193-9.
52. Oelke, M. and E. Martinelli, *[Pharmacological treatment of benign prostatic hyperplasia]*. Urologe A, 2016. **55**(1): p. 81-94; quiz 95-6.
53. Strittmatter, F., et al., *[Medical therapy of lower urinary tract symptoms [corrected]]*. Urologe A, 2012. **51**(8): p. 1125-36.
54. Lee, S.H., et al., *Effects of obesity on lower urinary tract symptoms in Korean BPH patients*. Asian J Androl, 2009. **11**(6): p. 663-8.
55. Kim, J.M., et al., *Effect of obesity on prostate-specific antigen, prostate volume, and international prostate symptom score in patients with benign prostatic hyperplasia*. Korean J Urol, 2011. **52**(6): p. 401-5.
56. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. Circulation, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
57. Oelke, M., et al., *EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction*. Eur Urol, 2013. **64**(1): p. 118-40.
58. Hofner, K., et al., *[S2e guideline of the German urologists: Conservative and pharmacologic treatment of benign prostatic hyperplasia]*. Urologe A, 2016. **55**(2): p. 184-94.
59. Berges, R., et al., *[Therapy of benign prostate syndrome (BPS): guidelines of the German Urologists (DGU)]*. Urologe A, 2009. **48**(12): p. 1503-16.
60. Reich, O., et al., *[Benign prostatic hyperplasia (BPH) : Surgical therapy options]*. Urologe A, 2010. **49**(1): p. 113-26.
61. Gratzke, C., et al., *[Surgical treatment of male lower urinary tract symptoms (LUTS)]*. Urologe A, 2012. **51**(9): p. 1297-306; quiz 1307.
62. Faul, P., et al., *Clinical and technical aspects of bipolar transurethral prostate resection*. Scand J Urol Nephrol, 2008. **42**(4): p. 318-23.
63. Rassweiler, J., et al., *Bipolar transurethral resection of the prostate--technical modifications and early clinical experience*. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2007. **16**(1): p. 11-21.
64. Mamoulakis, C., D.T. Ubbink, and J.J. de la Rosette, *Bipolar versus monopolar transurethral resection of the prostate: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Eur Urol, 2009. **56**(5): p. 798-809.
65. Madersbacher, S. and M. Marberger, *Is transurethral resection of the prostate still justified?* BJU Int, 1999. **83**(3): p. 227-37.
66. Lourenco, T., et al., *The clinical effectiveness of transurethral incision of the prostate: a systematic review of randomised controlled trials*. World J Urol, 2010. **28**(1): p. 23-32.
67. Tkocz, M. and A. Prajsner, *Comparison of long-term results of transurethral incision of the prostate with transurethral resection of the prostate, in patients with benign prostatic hypertrophy*. Neurourol Urodyn, 2002. **21**(2): p. 112-6.

68. Freyer, P.J., *A RECENT SERIES OF 60 CASES OF TOTAL ENUCLEATION OF THE PROSTATE FOR RADICAL CURE OF ENLARGEMENT OF THAT ORGAN*. Br Med J, 1905. **1**(2316): p. 1085-9.
69. Naspro, R., et al., *Holmium laser enucleation of the prostate versus open prostatectomy for prostates >70 g: 24-month follow-up*. Eur Urol, 2006. **50**(3): p. 563-8.
70. Varkarakis, I., et al., *Long-term results of open transvesical prostatectomy from a contemporary series of patients*. Urology, 2004. **64**(2): p. 306-10.
71. Bschiepfer, T., et al., *[S2e guideline of the German urologists: Instrumental treatment of benign prostatic hyperplasia]*. Urologe A, 2016. **55**(2): p. 195-207.
72. Bach, T., et al., *Laser treatment of benign prostatic obstruction: basics and physical differences*. Eur Urol, 2012. **61**(2): p. 317-25.
73. Cindolo, L., et al., *Patient's adherence on pharmacological therapy for benign prostatic hyperplasia (BPH)-associated lower urinary tract symptoms (LUTS) is different: is combination therapy better than monotherapy?* BMC Urol, 2015. **15**: p. 96.
74. Kruep, E.J., et al., *Early symptom improvement and discontinuation of 5-alpha-reductase inhibitor (5ARI) therapy in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH)*. Ann Pharmacother, 2014. **48**(3): p. 343-8.
75. Fullhase, C., et al., *Systematic review of combination drug therapy for non-neurogenic male lower urinary tract symptoms*. Eur Urol, 2013. **64**(2): p. 228-43.
76. Chapple, C.R., et al., *Silodosin therapy for lower urinary tract symptoms in men with suspected benign prostatic hyperplasia: results of an international, randomized, double-blind, placebo- and active-controlled clinical trial performed in Europe*. Eur Urol, 2011. **59**(3): p. 342-52.
77. Oelke, M., et al., *[Drug therapy of benign prostatic hyperplasia syndrome with alpha 1-receptor blockers. Basic principles and clinical results]*. Urologe A, 2002. **41**(5): p. 425-41.
78. Lepor, H., et al., *The efficacy of terazosin, finasteride, or both in benign prostatic hyperplasia. Veterans Affairs Cooperative Studies Benign Prostatic Hyperplasia Study Group*. N Engl J Med, 1996. **335**(8): p. 533-9.
79. Djavan, B., et al., *State of the art on the efficacy and tolerability of alpha1-adrenoceptor antagonists in patients with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia*. Urology, 2004. **64**(6): p. 1081-8.
80. Nickel, J.C., et al., *Comparison of dutasteride and finasteride for treating benign prostatic hyperplasia: the Enlarged Prostate International Comparator Study (EPICS)*. BJU Int, 2011. **108**(3): p. 388-94.
81. Kirby, R.S., et al., *Efficacy and tolerability of doxazosin and finasteride, alone or in combination, in treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia: the Prospective European Doxazosin and Combination Therapy (PREDICT) trial*. Urology, 2003. **61**(1): p. 119-26.
82. McConnell, J.D., et al., *The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia*. N Engl J Med, 2003. **349**(25): p. 2387-98.
83. Herschorn, S., et al., *Efficacy and tolerability of fesoterodine in men with overactive bladder: a pooled analysis of 2 phase III studies*. Urology, 2010. **75**(5): p. 1149-55.
84. Abrams, P., et al., *Safety and tolerability of tolterodine for the treatment of overactive bladder in men with bladder outlet obstruction*. J Urol, 2006. **175**(3 Pt 1): p. 999-1004; discussion 1004.
85. Kedia, G.T., et al., *The nitric oxide pathway in the human prostate: clinical implications in men with lower urinary tract symptoms*. World J Urol, 2008. **26**(6): p. 603-9.
86. Oelke, M., et al., *Monotherapy with tadalafil or tamsulosin similarly improved lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia in an*

- international, randomised, parallel, placebo-controlled clinical trial.* Eur Urol, 2012. **61**(5): p. 917-25.
87. Gacci, M., et al., *A systematic review and meta-analysis on the use of phosphodiesterase 5 inhibitors alone or in combination with alpha-blockers for lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia.* Eur Urol, 2012. **61**(5): p. 994-1003.
 88. Wilt, T.J., et al., *Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia.* Public Health Nutr, 2000. **3**(4a): p. 459-72.
 89. Scaglione, F., et al., *Comparison of the potency of different brands of Serenoa repens extract on 5alpha-reductase types I and II in prostatic co-cultured epithelial and fibroblast cells.* Pharmacology, 2008. **82**(4): p. 270-5.
 90. Wilt, T.J., et al., *Saw palmetto extracts for treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review.* Jama, 1998. **280**(18): p. 1604-9.
 91. Roehrborn, C.G., et al., *The effects of combination therapy with dutasteride and tamsulosin on clinical outcomes in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia: 4-year results from the CombAT study.* Eur Urol, 2010. **57**(1): p. 123-31.
 92. Kaplan, S.A., et al., *Tolterodine and tamsulosin for treatment of men with lower urinary tract symptoms and overactive bladder: a randomized controlled trial.* Jama, 2006. **296**(19): p. 2319-28.
 93. Geeves, M.A. and K.C. Holmes, *Structural mechanism of muscle contraction.* Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 687-728.
 94. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle.* Nature, 1994. **372**(6503): p. 231-6.
 95. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II.* J Physiol, 2000. **522 Pt 2**: p. 177-85.
 96. Shen, R.F. and H.H. Tai, *Thromboxanes: synthase and receptors.* J Biomed Sci, 1998. **5**(3): p. 153-72.
 97. Nakahata, N., *Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology.* Pharmacol Ther, 2008. **118**(1): p. 18-35.
 98. Strittmatter, F., et al., *Thromboxane A2 induces contraction of human prostate smooth muscle by Rho kinase- and calmodulin-dependent mechanisms.* Eur J Pharmacol, 2011. **650**(2-3): p. 650-5.
 99. Saita, Y., et al., *Endothelin receptors and their cellular signal transduction mechanism in human cultured prostatic smooth muscle cells.* Br J Pharmacol, 1997. **121**(4): p. 687-94.
 100. Walden, P.D., et al., *Endothelin-1 production and agonist activities in cultured prostate-derived cells: implications for regulation of endothelin bioactivity and bioavailability in prostatic hyperplasia.* Prostate, 1998. **34**(4): p. 241-50.
 101. Inoue, A., et al., *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2863-7.
 102. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.* Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
 103. Takuwa, N., et al., *A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts.* J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7856-61.
 104. Kobayashi, S., et al., *Binding and functional properties of endothelin receptor subtypes in the human prostate.* Mol Pharmacol, 1994. **45**(2): p. 306-11.
 105. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.* Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
 106. Callaghan, B. and J.B. Furness, *Novel and conventional receptors for ghrelin, desacyl-ghrelin, and pharmacologically related compounds.* Pharmacol Rev, 2014. **66**(4): p. 984-1001.

107. Cameron, K.O., S.K. Bhattacharya, and A.K. Loomis, *Small molecule ghrelin receptor inverse agonists and antagonists*. J Med Chem, 2014. **57**(21): p. 8671-91.
108. Ukkola, O. and S. Poykko, *Ghrelin, growth and obesity*. Ann Med, 2002. **34**(2): p. 102-8.
109. Ueberberg, B., et al., *Expression of ghrelin and its receptor in human tissues*. Horm Metab Res, 2009. **41**(11): p. 814-21.
110. Gnanapavan, S., et al., *The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(6): p. 2988.
111. L-692,585 [Product Information]. Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich. 2016.
112. MK 0677 [Product Information]. Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich. 2016.
113. Custodiol® [Gebrauchs- und Fachinformation]. Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland. 2015.
114. Kim, H.R., et al., *Smooth muscle signalling pathways in health and disease*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6a): p. 2165-80.
115. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
116. Roti®-Load 1 [Gebrauchsanweisung]. Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland 2017.
117. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
118. DC Protein Assay [Instruction Manual]. Bio Rad, Hercules, CA, Vereinigte Staaten.
119. VECTASTAIN® ABC KIT [Supplementary Protocols: Enzyme Immunoassays, Hybridoma Screening and Western Blots] Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, Vereinigte Staaten. 2014.
120. VECTASTAIN® ABC KIT [Instructions for Immunohistochemical Staining]. Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, Vereinigte Staaten. 2017.
121. Thorpe, G.H., et al., *Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays*. Clin Chem, 1985. **31**(8): p. 1335-41.
122. Ichibangase, T., et al., *Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H₂O₂*. Luminescence, 2014. **29**(2): p. 118-21.
123. Moreland, R.B., *In vitro models: research in physiology and pharmacology of the lower urinary tract*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 2**: p. S56-61.
124. Kim, N., et al., *Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 437-42.
125. Hawksworth, G.M., *Advantages and disadvantages of using human cells for pharmacological and toxicological studies*. Hum Exp Toxicol, 1994. **13**(8): p. 568-73.
126. Wang, Y., et al., *Smooth muscle contraction and growth of stromal cells in the human prostate are both inhibited by the Src family kinase inhibitors, AZM475271 and PP2*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(23): p. 3342-3358.
127. Kunit, T., et al., *Inhibition of smooth muscle force generation by focal adhesion kinase inhibitors in the hyperplastic human prostate*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **307**(7): p. F823-32.
128. Levitt, J.M. and K.M. Slawin, *Prostate-specific antigen and prostate-specific antigen derivatives as predictors of benign prostatic hyperplasia progression*. Curr Urol Rep, 2007. **8**(4): p. 269-74.
129. Katugampola, S.D., Z. Pallikaros, and A.P. Davenport, *[125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue*.

- up-regulation of receptors with atherosclerosis*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(1): p. 143-9.
130. Denney, W.S., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PF-05190457: The first oral ghrelin receptor inverse agonist to be profiled in healthy subjects*. Br J Clin Pharmacol, 2017. **83**(2): p. 326-338.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von 3-[[<i>(2R)</i> -2-Hydroxypropyl]amino]-3-methyl- <i>N</i> -[<i>(3R)</i> -2,3,4,5-tetrahydro-2-oxo-1-[[2'-(1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)][1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-1 <i>H</i> -1-benzazepin-3-yl]-butanamide (L-692,585) [111].	38
Abbildung 2: Strukturformel von 2-Amino- <i>N</i> -[<i>(1R)</i> -2-[1,2-dihydro-1-(methylsulfonyl)spiro[3 <i>H</i> -indole-3,4'-piperidin]-1'-yl]-2-oxo-1-[(phenylmethoxy)methyl]ethyl]-2-methylpropanamide methanesulfonate (MK 0677) [112].	38
Abbildung 3: Skizze Versuchsaufbau Organbadversuch.	42
Abbildung 4: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch EFS ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SEM von Experimenten mit Prostatageweben von n = 6 Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden. #p < 0,05 für jeweilige Frequenz nach multivariater Analyse bzw. p im Insert für ganze Gruppen nach two-way ANOVA.	65
Abbildung 5: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch Noradrenalin ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SEM von Experimenten mit Prostatageweben von n = 7 Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden. #p < 0,05 für jeweilige Konzentration nach multivariater Analyse bzw. p im Insert für ganze Gruppen nach two-way ANOVA.	67
Abbildung 6: Auswirkungen von MK 0677 auf die durch Phenylephrin ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SEM von Experimenten mit Prostatageweben von n = 6 Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der MK 0677-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden. #p < 0,05 für jeweilige Konzentration nach multivariater Analyse bzw. p im Insert für ganze Gruppen nach two-way ANOVA.	69
Abbildung 7: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch U46619 ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SEM von Experimenten mit Prostatageweben von n = 5 Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden.	71
Abbildung 8: Auswirkungen von L-692,585 auf die durch Endothelin-1 ausgelöste Gewebekontraktion. Gezeigt sind Mittelwerte +/- SEM von Experimenten mit Prostatageweben von n = 6 Patienten, wobei Proben jeder Prostata sowohl der L-692,585-Gruppe als auch der Kontrollgruppe zugeführt wurden.	73
Abbildung 9: Repräsentative Färbung einer Serie mit 5 Gewebeproben. Färbungen von links oben nach rechts unten mit DAPI, sowie Antikörpern gegen den GHSR und Calponin, bzw. überlagertes Bild aller drei Farbkanäle (Fusion).	75
Abbildung 10: GHSR 41kDa.	76
Abbildung 11: Calponin 34 kDa.	76
Abbildung 12: pan-Zytokeratin 37-55 kDa.	77
Abbildung 13: PSA 29 kDa.	77
Abbildung 14: Beta-Aktin 42 kDa.	77

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Lösungen Organbadversuch.	43
Tabelle 2: Übersicht Versuchsreihen.	44
Tabelle 3: Versuchsprotokoll Organbadversuch.	45
Tabelle 4: Verwendete Frequenzen bei der elektrischen Feldstimulation.	47
Tabelle 5: Pipettierschema Noradrenalin.	47
Tabelle 6: Pipettierschema Phenylephrin.	48
Tabelle 7: Pipettierschema U46619.	49
Tabelle 8: Pipettierschema Endothelin-1.	50
Tabelle 9: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern Immunfluoreszenz.	52
Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper Immunfärbung.	54
Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper Immunfärbung.	54
Tabelle 12: Zusammensetzung Gele und Gelpuffer.	56
Tabelle 13: Zusammensetzung Laufpuffer.	57
Tabelle 14: Zusammensetzung Transferpuffer Western-Blot.	58
Tabelle 15: Zusammensetzung Blocklösung.	59
Tabelle 16: Primärantikörper Western-Blot.	60
Tabelle 17: Zusammensetzung Lösungen Chemilumineszenz.	61
Tabelle 18: Zeitpunkte Bestimmung Kontraktionszustand.	62

10. Publikationen

Wang X, Wang Y, Gratzke C, **Sterr C**, Yu Q, Li B, Strittmatter F, Herlemann A, Tamalunas A, Rutz B, Ciotkowska A, Waidelich R, Liu C, Stief CG, Hennenberg M.

Ghrelin Aggravates Prostate Enlargement in Rats with Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia, Stromal Cell Proliferation, and Smooth Muscle Contraction in Human Prostate Tissues.

Oxid Med Cell Longev. 2019 Nov 22;2019:4748312

Yu Q, Gratzke C, Wang Y, Herlemann A, **Sterr CM**, Rutz B, Ciotkowska A, Wang X, Strittmatter F, Stief CG, Hennenberg M.

Inhibition of human prostate smooth muscle contraction by the LIM kinase inhibitors, SR7826 and LIMKi3.

British Journal of Pharmacology, 2018. Jun;175(11):2077-2096

11. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Martin Hennenberg möchte ich mich ganz besonders für die Überlassung des Themas sowie seine ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Christian Stief, Direktor der Urologischen Klinik, für die großzügige Bereitstellung sämtlicher Materialien und Geräte, die zur Durchführung dieser Studie erforderlich waren.

Dem Pathologischen Institut und seinen Mitarbeitern möchte ich für die erstklassige Vorbereitung der Gewebeproben danken.

Bei Herrn Yiming Wang sowie Herrn Quing Feng Yu möchte ich mich für die geduldige Einarbeitung im Labor sowie für die anschließend gute und unterhaltsame Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Frau Beata Rutz danke ich für die praktische Unterstützung im Labor bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Nicolas Wiemer möchte ich mich besonders für die Vermittlung des persönlichen Kontaktes zu Herrn Prof. Dr. Martin Hennenberg bedanken.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen dafür danken, dass sie mich zu jeder Zeit während meines Studiums und auch bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt und motiviert haben.

Eidesstattliche Versicherung

Sterr, Christian Maximilian

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Effekte der Ghrelin-Rezeptor-Agonisten L-692,585 und MK 0677 auf die glattnuskuläre Kontraktion humanen Prostatagewebes

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.03.2021

Christian Maximilian Sterr